

PCT WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales Büro
INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)



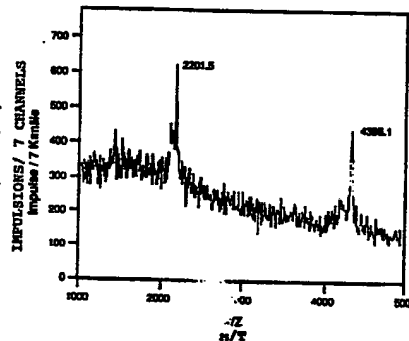
| | | |
|---|------------------|---|
| <p>(51) Internationale Patentklassifikation 5 : C07K 7/10, A61K 37/24 G01N 33/74</p> | <p>A1</p> | <p>(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 91/06564</p> <p>(43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 16. Mai 1991 (16.05.91)</p> |
| <div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div style="width: 48%;"> <p>(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP90/01807</p> <p>(22) Internationales Anmeldedatum: 25. Oktober 1990 (25.10.90)</p> <p>(30) Prioritätsdaten: P 39 35 738.4 27. Oktober 1989 (27.10.89) DE</p> <p>(71)(72) Anmelder und Erfinder: FORSSMANN, Wolf-Georg [DE/DE]; Blücher-Straße 5, D-3000 Hannover 1 (DE).</p> <p>(72) Erfinder; und</p> <p>(75) Erfinder/Anmelder (nur für US) : HERBST, Franz [DE/DE]; Goethestraße 23 b, D-6907 Nußloch (DE). SCHULZ-KNAPPE, Peter [DE/DE]; Am Kriegergarten 2, D-6730 Neustadt a.d.W. (DE). ADERMANN, Knut [DE/DE]; Robertstraße 4, D-3000 Hannover 61 (DE). GAGELMANN, Michael [DE/DE]; Wormser-Straße 9, D-6905 Schriesheim (DE).</p> </div> <div style="width: 48%;"> <p>(74) Anwälte: STERNAGEL, Hans-Günther usw. ; Sander Aue 30, D-5060 Bergisch Gladbach 2 (DE).</p> <p>(81) Bestimmungsstaaten: AT (europäisches Patent), AU, BE (europäisches Patent), BG, BR, CA, CH (europäisches Patent), DE (europäisches Patent), DK (europäisches Patent), ES (europäisches Patent), FI, FR (europäisches Patent), GB (europäisches Patent), GR (europäisches Patent), HU, IT (europäisches Patent), JP, KR, LU (europäisches Patent), MC, NL (europäisches Patent), NO, RO, SE (europäisches Patent), SU, US.</p> <p>Veröffentlicht <i>Mit internationalem Recherchenbericht. Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist. Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.</i></p> </div> </div> | | |

(54) Title: **hPTH (1-37) FRAGMENT, ITS PRODUCTION, DRUG CONTAINING IT AND ITS USE**

(54) Bezeichnung: **hPTH-FRAGMENT-(1-37), SEINE HERSTELLUNG, DIESES ENTHALTENDE ARZNEIMITTEL UND SEINE VERWENDUNG**

(57) Abstract

A human blood peptide, hPTH (1-37), the structure of which has been elucidated, can be used as a drug for diagnostic, medical and industrial purposes. The isolation of an hPTH (38-84) fragment demonstrates the existence of the hPTH (1-37). Removal of amino-terminal amino acids on the hPTH (1-37) reduces its biological activity. The hPTH (1-37) which circulates in the blood is identical to the synthetic reference substance hPTH (1-37), but not fragments such as hPTH (1-33), hPTH (1-34) or hPTH (1-38). The existence of the hPTH (1-37) molecular form was proved by mass spectroscopy (plasma desorption method). A different biological activity and differences in the three-dimensional peptide structure between the hPTH (1-37) fragment and other hPTH fragments prove that this hPTH fragment is the preferred natural peptide of the parathormone family, which should be used for treating diseases of the parathyroids, the circulatory and respiratory systems, the male genital organ and the kidneys.



(57) Zusammenfassung

Die Erfindung betrifft ein Peptid aus menschlichem Blut, das hPTH-(1-37), das zum Zwecke der diagnostischen, medizinischen und gewerblichen Verwendung als Arzneimittel in seiner Struktur aufgeklärt wurde. Die Isolierung eines Fragments hPTH-(38-84) beweist die Existenz des hPTH-(1-37). Entfernung amino-terminaler Aminosäuren am hPTH-Fragment-(1-37) vermindert seine biologische Wirksamkeit. Das im Blut zirkulierende hPTH-(1-37) ist identisch mit der synthetischen Referenzsubstanz hPTH-(1-37), nicht aber mit Fragmenten wie hPTH-(1-33), hPTH-(1-34) oder hPTH-(1-38). Die Molekülform hPTH-(1-37) wurde durch Massenspektrometrie (Plasmadesorptionsverfahren) bewiesen. Unterschiedliche biologische Aktivität und Unterschiede in der räumlichen Peptidstruktur des hPTH-Fragments-(1-37) gegenüber anderen hPTH-Fragmenten beweisen, daß dieses hPTH-Fragment das vorzügliche, natürliche Peptid der Parathormonfamilie darstellt, welche zur Behandlung von Erkrankungen von Nebenschilddrüse, Kreislauf, Atemwege, männlichem Genitalorgan und Nieren benutzt werden sollte.

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Code, die zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

| | | | | | |
|----|--------------------------------|----|-----------------------------------|----|--------------------------------|
| AT | Österreich | ES | Spanien | MC | Madagaskar |
| AU | Australien | FI | Finnland | ML | Mali |
| BB | Barbados | FR | Frankreich | MR | Mauritanken |
| BE | Belgien | GA | Gabon | MW | Malawi |
| BF | Burkina Faso | GB | Vereinigtes Königreich | NL | Niederlande |
| BG | Bulgarien | GR | Griechenland | NO | Norwegen |
| BJ | Benin | HU | Ungarn | PL | Polen |
| BR | Brasilien | IT | Italien | RO | Rumänien |
| CA | Kanada | JP | Japan | SD | Sudan |
| CF | Zentrale Afrikanische Republik | KP | Demokratische Volksrepublik Korea | SE | Schweden |
| CG | Kongo | KR | Republik Korea | SN | Senegal |
| CH | Schweiz | LI | Liechtenstein | SU | Soviet Union |
| CI | Côte d'Ivoire | LK | Sri Lanka | TD | Tschad |
| CM | Kamerun | LU | Luxemburg | TG | Togo |
| DE | Deutschland | MC | Monaco | US | Vereinigte Staaten von Amerika |
| DK | Dänemark | | | | |

Beschreibung

hPTH-Fragment-(1-37), seine Herstellung, dieses enthaltende Arzneimittel und seine Verwendung

Die vorliegende Erfindung betrifft ein hPTH-Fragment-(1-37), seine Herstellung, dieses enthaltende Arzneimittel und seine Verwendung.

Humanes Parathormon (hPTH), das Hormon der Nebenschilddrüsen, stellt ein potentiell wichtiges therapeutisches Hilfsmittel, z.B. für die Behandlung der Osteoporose und des Hypoparathyreoidismus, dar.

Die Osteoporose (Verminderung der Knochenmasse) (*Riggs und Melton, N. Engl. J. Med.* 314 1676-1686, 1986) ist eine häufige Krankheit, von der vor allem Frauen in der Menopause und ältere Menschen betroffen sind. Die Betroffenen leiden je nach Ausprägung unter häufigen Frakturen im Bereich der Wirbelsäule, der Unterarme oder Oberschenkel, Schmerzen bis zur völligen Unbeweglichkeit, Verlust der Arbeitsfähigkeit und sozialer Kontakte sowie einem höheren Sterblichkeitsrisiko. Eine Heilung gilt derzeit als kaum möglich (*Consensus Development Conference: Prophylaxis and Treatment of Osteoporosis*, 1987). Tierexperimentelle Untersuchungen (*Selye, Endocrinology*, 16, 547-558, 1932; *Kalu et al., Lancet* 1363-1366, 1970; *Hefli et al., Clin. Science* 62, 389-396, 1982; *Tam et al., Endocrinology* 110, 506-512, 1982; *Podbesek et al., Endocrinology* 112, 1000-1006, 1983; *Gunness-Hey und Hock, Metab. Bone Dis. & Rel. Res.* 5, 177-181, 1984) sowie neuere histomorphometrische Befunde beim primären Hyperparathyreoidismus (*Delling et al., Klin. Wochenschr.* 65, 643-653, 1987) legen die Vermutung nahe, daß durch eine Behandlung mit PTH eine Zunahme der Knochenmasse erzielt werden kann. Reeve et al. (*Br. Med. J.* 1340-134, 1980) erreichten bei Patienten mit Osteoporose durch täglich verabreichte kleine Dosen von PTH tatsächlich eine Verbesserung der trabekulären Knochenstruktur bei jedoch

leicht abnehmender corticaler Knochenmasse. Neuere Befunde sprechen dafür, daß PTH bei zusätzlicher Verabreichung von knochenaktiven Substanzen, wie z.B. 1,25-Vitamin-D₃ (Slovik et al., *J. Bone Miner. Res.* 1, 377-381, 1986), Calcitonin (Hesch et al., *Calcif. Tissue Int.* 44, 176-180, 1989) oder Östrogen (Reeve et al., *Proceedings of the 5th International Congress on Bone Morphometry, Niigata*, 24.-29.7. 1988), die Knochenmasse der Spongiosa ohne Corticalis-Verlust erhöht.

Der Hypoparathyreoidismus (PTH-Mangel) (Kruse, *Monatsschr. Kinderheilkunde* 136, 652-666, 1988) tritt entweder congenital oder als Folge einer Operation oder von Bestrahlungen im Halsbereich auf und führt zu einer erniedrigten Calcium-Konzentration im Blut. Die Patienten neigen zu Krampfanfällen. Besteht der PTH-Mangel bereits im Kindesalter, drohen langfristig verminderte geistige Entwicklung und eine defekte Zahn- und Knochenentwicklung. Eine Therapie mit Calcium- und/oder Vitamin-D-Präparaten normalisiert zwar bei den meisten Patienten die Calcium-Konzentration im Serum, ist jedoch mit einem erhöhten Risiko von Nierenschädigungen verbunden. Dieses Risiko einer medikamentösen Behandlung kann durch eine Hormonsubstitutionstherapie mit PTH vermieden werden.

Schließlich hat sich in jüngster Zeit gezeigt, daß das Parathyreoidhormon blutdrucksenkende Wirksamkeit aufweist (Nickols, *Blood Vessels* 24, 120-124, 1987).

Sowohl bei der Behandlung von Osteoporose und Hypertonus als auch bei der Hormonsubstitution bei Hypoparathyreoidismus muß das PTH regelmäßig über einen langen Zeitraum, gegebenenfalls lebenslang, verabreicht werden. Das verwendete PTH muß deshalb frei von Verunreinigungen sein und darf nicht die Bildung von Antikörpern hervorrufen. Diesen Anforderungen kann am wirksamsten durch chemisch oder gentechnologisch synthetisierte Peptide mit der Aminosäuresequenz des menschlichen PTH entsprochen werden. Das sezernierte PTH-Molekül besteht aus 84 Aminosäuren [hPTH-(1-84)] dieser Größenordnung

sind einer chemischen Synthese jedoch nur schwer zugänglich und besser gentechnologisch herstellbar.

Bisher sind zwei verschiedene Peptide mit den aminoterminalen Teilsequenzen des humanen PTH - das hPTH-(1-34) und das hPTH-(1-38) - synthetisiert worden. Bei der klinischen Erprobung im Rahmen einer Einmalinjektion für eine diagnostische Anwendung zeigten sich sowohl bei hPTH-(1-34) (*Mallette et al., J. Clin Endocrin. Metab.* 67, 964-972, 1988) als auch bei hPTH-(1-38) (*Kruse und Kracht, Eur. J. Pediatr.* 146, 373-377, 1987) die aufgrund früherer Erfahrungen mit extrahiertem Rinder-PTH (bPTH) erwarteten kurzfristigen Effekte, d.h. vorübergehende Stimulation der Ausscheidung von Phosphat und cyclischem Adenosinmonophosphat (cAMP) im Urin und vorübergehende Erhöhung der cAMP-Konzentration im Plasma.

Bei der therapeutischen Erprobung dieser Peptide bei einer kleinen Anzahl von Osteoporose-Patienten konnten sowohl mit hPTH-(1-34) (*Reeve et al., Proceedings of the 5th International Congress on Bone Morphometry, Niigata, 24.-29.7.1988*) als auch mit hPTH-(1-38) (*Hesch et al., Calcif. Tissue Int* 44, 176-180, 1989) gewisse Erfolge erzielt werden.

Nachteilig an den bisher für die klinische Anwendung verfügbaren PTH-Fragmenten ist jedoch, daß sie in einigen Patienten die **Bildung von Antikörpern hervorrufen**, welche die **Wirkung der exogen zugeführten Fragmente** oder sogar des körpereigenen PTH **aufheben** können [vgl. beispielsweise für hPTH-(1-34), *Audran et al., J. Clin. Endocrinol. Metab.* 64, 937-943, 1987 und für hPTH-(1-38) *Stögmänn et al., Monatsschr. Kinderheilk.* 136, 107 1988].

Vor etwa 20 Jahren wiesen Berson und Yalow (*J. Clin Endocrinol. Metab.* 28, 1037-1047, 1968) nach, daß verschiedene PTH-Fragmente im menschlichen Plasma vorkommen, die entweder durch raschen peripheren Abbau des Gesamtmoleküls oder aber durch Sekretion von PTH-Fragmenten entstanden sein konnten. Es zeigte

sich, daß die in der Zirkulation mengenmäßig überwiegenden Produkte des peripheren PTH-Metabolismus große carboxyterminale PTH-Fragmente ohne biologische Aktivität sind, die in der Leber gebildet werden (beispielsweise *D'Amour und Huet, Am. J. Physiol.* 246, E249-255, 1984). Aufgrund der vorliegenden Untersuchungsergebnisse wurde angenommen, daß bei intakter Nierenfunktion das hPTH-(1-84) die dominierende biologisch aktive PTH-Form ist. Bei eingeschränkter Nierenfunktion trat hingegen in fraktioniertem Plasma der jeweiligen Patienten in der Elutionsposition des hPTH-(1-34) ein deutlicher Gipfel in Erscheinung (vgl. *Grunbaum et al., Am. J. Physiol.* 247, E442-448, 1984).

Die Existenz eines biologisch aktiven, im menschlichen Plasma gesunder Patienten zirkulierenden PTH-Fragments konnte bisher nicht nachgewiesen werden.

Es ist daher verschiedentlich versucht worden, den endogenen Abbau des PTH durch *in vitro* Untersuchungen zu simulieren, um auf diese Weise Rückschlüsse auf primäre Spaltstellen in dem Gesamtmolekül zu ziehen. In diesem Zusammenhang wurde nahezu jede Position zwischen den Aminosäuren Nr. 5 und Nr. 43 des aminoterminalen Endes in Betracht gezogen (vgl. beispielsweise *Barling et al., Int. J. Biochem.*, 16, 815-821, 1984). Unter anderem führten *Zull und Chuang (J. Biol. Chem.* 260, 1608-1613, 1985) Untersuchungen mit bPTH und Cathepsin D durch. Sie konnten nachweisen, daß bei der enzymatischen Spaltung von Rinder-PTH (bPTH) mit dem aus Rindermilz stammenden Enzym die C-terminalen Fragmente (35-84) und (38-84) sowie die komplementären N-terminalen Fragmente (1-34) und (1-37) gebildet werden. Gegenüber dem von uns gefundenen Fragment hPTH-(1-37) unterscheidet sich das in dieser Arbeit beschriebene bPTH in den Positionen 1 (Ser anstatt Ala), 7 (Leu anstatt Phe) und 16 (Asn anstatt Ser). Die letztgenannten, bovinen Fragmente erwiesen sich bei *in vitro* Untersuchungen mit Nierenmembranen aus Ratte und Rind als biologisch aktiv, wobei jedoch das Fragment-(1-37) nur in sehr geringen Mengen nachweisbar war und schnell zu

Fragment-(1-34) hydrolysiert wurde. Die Autoren schlossen daraus, daß das Endprodukt des enzymatischen Abbaus von PTH durch Cathepsin D beim Rind das Fragment-(1-34) ist. Demgegenüber bezweifelten andere Autoren, daß *in vivo* überhaupt N-terminale PTH-Fragment im Plasma erscheinen (vgl. beispielsweise *Goltzman et al., J. Clin. Invest.* 65, 1309-1317, 1980). So konnten bei normalen Ratten keine durch peripheren Abbau gebildeten, biologisch aktiven, N-terminalen PTH-Fragmente nachgewiesen werden (*Bringinghurst et al., Am. J. Physiol.* 255, E886-893, 1982). *MacGregor et al., (J. Biol. Chem.* 261, 1929-1934, 1986) fanden, daß bovine Nebenschilddrüsen in Kultur keine biologisch aktiven, N-terminalen PTH-Fragmente sezernieren. **Zusammengefaßt legen diese Befunde zum Zeitpunkt der vorliegenden Erfindung nahe, daß im menschlichen oder tierischen Blutplasma keine biologisch aktiven, N-terminalen PTH-Fragmente zirkulieren.**

Es ist **Aufgabe der vorliegenden Erfindung**, ein neues hPTH-Fragment-(1-37) bereitzustellen, das ein gut zugängliches Arzneimittel mit der biologischen und therapeutischen Aktivität von natürlichem Parathormon (PTH) ist, welches mindestens den Wirkungsgrad der bekannten hPTH-Fragmente (1-34) und (1-38) aufweist und deren Nachteile - insbesondere die Induktion der Antikörperbildung - vermeidet.

Weitere Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist die Bereitstellung eines Herstellungsverfahrens für dieses hPTH-Fragment-(1-37) sowie die Anwendung als Arzneimittel für verschiedene therapeutische und diagnostische Indikationen.

Diese Aufgaben werden durch ein hPTH-Fragment mit neuer Aminosäuresequenz gelöst.

Die vorliegende Erfindung betrifft somit:

Ein hPTH-Fragment-(1-37) mit der Aminosäuresequenz Ser - Val - Ser - Glu - Ile - Gln - Leu - Met - His - Asn - Leu - Gly - Lys - His - Leu - Asn - Ser - Met - Glu - Arg - Val - Glu - Trp - Leu - Arg - Lys - Lys - Leu - Gln - Asp - Val - His - Asn - Phe - Val - Ala - Leu sowie seine natürlichen und pharmakologisch verträglichen Derivate, insbesondere amidierte, acetylierte, phosphorylierte und glycosylierte hPTH-(1-37)-Derivate.

Die vorliegende Erfindung betrifft weiter ein Verfahren zur Herstellung dieses hPTH-Fragmentes-(1-37) oder seiner Derivate dadurch gekennzeichnet, daß dieses über eine prokaryontische oder eine eukaryontische Expression hergestellt und chromatographisch gereinigt wird, sowie ein weiteres Verfahren zur Herstellung des hPTH-Fragmentes-(1-37) oder seiner Derivate, indem man es aus menschlichem Blut über Chromatographie-Verfahren in bekannter Weise isoliert, und schließlich ein Verfahren zur Herstellung des hPTH-Fragmentes-(1-37) oder seiner Derivate, indem man dieses hPTH-Fragment durch die üblichen Verfahren der Festphasen- und Flüssigphasen-Synthese aus den geschützten Aminosäuren, die in der angegebenen Sequenz enthalten sind, herstellt, deblockiert und es mit den gängigen Chromatographie-Verfahren reinigt.

Erfindungsgemäß hat es sich überraschenderweise gezeigt, daß das kürzeste hPTH-Fragment mit voller biologischer Aktivität, welches durch primäre Spaltung des hPTH-(1-84) im menschlichen Körper entsteht, das hPTH-(1-37) ist (vgl. Beispiel 1). Überraschenderweise zeigte sich auch, daß sich die Raumstruktur von hPTH-(1-37) deutlich von den bisher bekannten Fragmenten unterscheidet (vgl. Beispiel 5), was auf seine besonderen Struktur-Wirkungs-Beziehungen und Antigen-Eigenschaften hinweist.

Das hPTH-Fragment-(1-37) wurde chemisch synthetisiert (vgl. Beispiel 2) und als Arzneimittel zubereitet. Auch die gentechnologische Herstellung über übliche

Vektoren ist erarbeitet: auf gentechnologischem Wege wird das hPTH-(1-37) Peptid sowohl (1) in pro- als auch (2) in eukaryontischen Organismen hergestellt. Für die prokaryontische Expression benutzen wir vorzugsweise *Escherichia coli*. Hierfür stehen u.a. Expressionsvektoren zur sekretorischen Expression (z.B. pSP6, pRit-Derivate, Pharmacia), zur direkten cytoplasmatischen Expression (z.B. pKK-Derivate, Pharmacia) oder Expression als Fusionsprotein (pMC1871, Pharmacia) zur Verfügung (Literatur siehe bei Marston *et al.*, *Biochem. J.*, 240, 1-12, 1986). Für die eukaryontische Expression haben wir verschiedene Organismen und Vektoren zur Verfügung, z.B. Insektenzellen (Summers and Smith, *Tex.Agric.Exp.Stn.(bull)* 1555, 1987), Hefen (Hitzeman *et al.*, *Nature*, 293, 717-722, 1981), filamentöse Pilze (Yelton *et al.*, *Proc.Natl.Acad.Sci.USA*, 81, 1470-1474, 1984) und Säugerzellen (Zettlmeissl *et al.*, *Biotechnology*, 5, 720-725, 1987), von denen wir vorzugsweise die Insektenzellen benutzen. Das exprimierte Peptid wird mit Methoden der Chromatographie gereinigt, vorzugsweise wie in Beispiel 1 angegeben.

Die Arzneimittelzubereitung enthält hPTH-(1-37) oder ein physiologisch verträgliches Salz des hPTH-(1-37). Die Form und Zusammensetzung des Arzneimittels, welches das hPTH-(1-37) enthält, richtet sich nach der Art der Verabreichung. Das humane PTH-(1-37) kann parenteral, intranasal, oral und mittels Inhalation verabreicht werden. Vorzugsweise wird hPTH-(1-37) zu einem Injektionspräparat, entweder als Lösung oder als Lyophilisat zur Auflösung unmittelbar vor Gebrauch, konfektioniert. Die Arzneimittelzubereitung kann außerdem Hilfsstoffe enthalten, die abfülltechnisch bedingt sind, einen Beitrag zur Löslichkeit, Stabilität oder Sterilität des Arzneimittels leisten oder den Wirkungsgrad der Aufnahme in den Körper erhöhen. Die zu verabreichende Tagesdosis hängt von der Indikation ab. Bei der Therapie der Osteoporose durch i.v./i.m. Injektion liegt sie im Bereich von 100 bis 1200 Einheiten (μg)/Tag, bei täglicher subcutaner Injektion vorzugsweise bei 300 - 2400 Einheiten (μg)/Tag. Die Bestimmung der biologischen Aktivität basiert auf Messungen gegen internationale und hauseigene

Referenzpräparationen für humane PTH-Fragmente in einem gebräuchlichen biologischen Testverfahren für hPTH-Fragmente.

Das erfindungsgemäße Fragment hPTH-(1-37) eignet sich in besonderer Weise als Langzeit-Therapeutikum bei Hypoparathyreoidismus und Osteoporose, da es über eine ausgezeichnete biologische Wirksamkeit verfügt und andererseits auch bei lebenslanger Dauerbehandlung keine Immunreaktion auslöst.

Das erfindungsgemäße Präparat ist ferner als Blutdruck-stabilisierendes Mittel und insbesondere zur Langzeit- bzw. Dauerbehandlung bei essentieller Hypertonie geeignet.

Das erfindungsgemäße Präparat ist weiter als Mittel zur Therapie von Nierenerkrankungen, in der Intensivpflege und bei Lungenerkrankungen anzuwenden (vgl. Beispiel 6).

Das erfindungsgemäße Präparat ist weiter als Mittel zur Therapie der männlichen Impotenz einzusetzen (vgl. Beispiel 6).

Die Erfindung wird nachfolgend anhand von Beispielen und den folgenden Abbildungen, auf die in den Beispielen Bezug genommen wird, erläutert:

Es zeigen:

Abb. 1: Sephadex G 25 - Präparative Large-Scale-Gel-Chromatographie des Alginsäure-Eluats zur Grobauftrennung nach Molekulargewicht und zur Entsalzung

des Rohpeptidextraktes. Im schraffierten Bereich befinden sich die durch RIA bestimmten hPTH-Fragmente.

Säule: Pharmacia K 100/100; ID 10 cm x 80 cm

Material: Sephadex G 25 medium

Eluent: 1 M Essigsäure

Flußrate: 5 ml/min

Absorption: 280 nm

Abb. 2: Präparative HPLC-Kationen-Austauscher-Chromatographie zur weiteren Auftrennung des Peptidmaterials aus Abbildung 1. Fraktionen 2 bis 5 von jeweils 16 ml enthalten je Fraktion mehr als 640 pMol hPTH-(44-68)-IR Material (schraffiert).

Säule: HPLC-Stahlsäule 2 cm x 10 cm

Material: Parcosil Pepkat

Eluent: A: 5 mM K_2HPO_4 pH 3,0; B: wie A in 1 M NaCl

Flußrate: 8 ml/min

Absorption: 280 nm

Gradient: 0 - 60 % B in 60 min

Abb. 3: Semipräparative RP-Chromatographie zur Auftrennung der Fraktionen 2 bis 5 aus Abbildung 2. In Fraktion 17 und Fraktion 20 von je 3 ml befinden sich jeweils mehr als 180 pMol durch RIA auf hPTH-(44-68) nachweisbare hPTH-Fragmente:

Säule: HPLC-Stahlsäule 1 cm x 10 cm

Material: Orpegen RP HD-Gel 7/300

Eluent: A: 0,01 M HCl; B: wie A in 80 % Acetonitril

Flußrate: 3 ml/min

Absorption: 280 nm

Gradient: 0 - 60 % B in 60 min

Temperatur: 45° C

Abb. 4: Aufarbeitung der Fraktion 20 aus Abbildung 3 mit semipräparativer Kationen-Austauscher-Chromatographie. Fraktionen 32 und 33 von je 10 ml enthalten 750 bzw. 600 pMol eines hPTH-Fragmentes, das mit dem RIA auf hPTH-(44-68) nachweisbar ist.

Säule: HPLC-Stahlsäule 1 cm x 5 cm

Material: Parcosil Pepkat

Eluent: A: 5 mM K_2HPO_4 pH 3,0; B: wie A in 1 M NaCl

Flußrate: 3 ml/min

Absorption: 230 nm

Gradient: 0 - 50 % B in 50 min.

Abb. 5: Zwischenschritt 1: Analytische RP-Chromatographie der Fraktionen 32 und 33 aus Abbildung 4. Es sind zwei Molekülformen von hPTH-(44-68)-IR nachweisbar, nämlich in Fraktion 12 von 3 ml mit über 150 pMol und in Fraktion 15 und 16 von je 3 ml mit jeweils über 300 pMol.

Säule: HPLC-Stahlsäule 1 cm x 10 cm

Material: Orpegen RP HD-Gel 7/300

Eluent: A: 0,1 % TFA; B: wie A in 80 % Acetonitril

Flußrate: 3 ml/min

Absorption: 280 nm

Gradient: 0 - 40 % B in 60 min

Temperatur: 45° C

Abb. 6: Zwischenschritt 2: Analytische Kationen-Austauscher-Chromatographie der Fraktionen 15 und 16 aus Abbildung 5. Die hPTH-(44-68)-IR Substanz ist besonders in Fraktion 9 von 2 ml (über 200 pMol) konzentriert.

Säule: HPLC-Stahlsäule 0,5 cm x 5 cm

Material: Parcosil Pepkat

Eluent: A: 5 mM K_2HPO_4 pH 3,0; B: wie A in 1 M NaCl

Flußrate: 0,7 ml/min

Absorption: 230 nm

Gradient: 0 - 50 % B in 50 min

Abb. 7: Hydrophobe-Interaktions-Chromatographie der Fraktionen 8 und 9 aus Abbildung 6. Die Fraktionen 5 bis 10 von je 0,87 ml enthalten das hPTH-(44-68)-IR Material in Konzentrationen von jeweils über 170 pMol/Fraktion.

Säule: HPLC-Stahlsäule 0,5 cm x 5 cm

Material: Parcosil Pro HIC

Eluent: A: 100 mM Na_2HPO_4 pH 6,5

B: wie A in 3 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$

Flußrate: 0,7 ml/min

Absorption: 230 nm

Gradient: 100 - 0 % B in 45 min

Abb. 8: Analytische RP-Chromatographie der Fraktionen 5 bis 10 aus Abbildung 7. Es zeigt sich ein Hauptpeak mit der hPTH-(44-68)-IR.

Säule: HPLC-Stahlsäule 0,5 x 10 cm

Material: Orpegen RP HD-Gel 7/300

Eluent: A: 0,1 % TFA; B: wie A in 80 % Acetonitril

Flußrate: 0,7 ml/min

Absorption: 230 nm

Gradient: 0 - 40 % B in 60 min

Temperatur: 25° C

Abb. 9: Analytische RP-Chromatographie zur Endreinigung des hPTH-Fragmentes. Das Material der Fraktion 25 aus Abbildung 8 wurde rechromatographiert, und es ergibt sich im Hauptpeak ein hochreines Peptid, dessen Sequenz als hPTH-(38-84) bestimmt wurde.

Säule: HPLC-Stahlsäule 0,5 cm x 10 cm

Material: Orpegen RP HD-Gel 7/300

Eluent: A: 0,1 % TFA; B: wie A in 80 % Acetonitril

Flußrate: 0,7 ml/min

Absorption: 230 nm

Gradient: 0 - 40 % B in 60 min

Temperatur: 45° C

Abb. 10: Reversed-Phase-HPLC-Chromatographie der synthetischen hPTH-Fragmente aus dem N-terminalen Bereich, nämlich hPTH-(1-33), hPTH-(1-34), hPTH-(1-37), hPTH-(1-38). Werden diese Fragmente als Referenz für natürliche, im Blut zirkulierende Fragmente des N-Terminus von hPTH benutzt, läßt sich darstellen, daß das hPTH-(1-37) die korrekte Molekülform im humanen Blut ist.

Säule: Parcosil ProRP 300 - 7, C4, 125 x 4 mm

Temperatur: 55° C

Eluent A: 0,1 % Trifluoressigsäure

B: wie A + 80 % Acetonitril

Gradient: Start - 25 % B

55 min - 50 % B

60 min - 100 % B

Absorption: 230 nm

Flußrate: 0,7 ml/min

Abb. 11: Zeitlicher Verlauf der intrazellulären cAMP-Konzentration von PC-12-Zellen nach Stimulation mit hPTH-Fragmenten. $1,5 \times 10^5$ Zellen wurden mit 10^{-7} M hPTH-(1-33), hPTH-(1-37) und hPTH-(1-38) in Gegenwart von 10^{-4} M IBMX 0, 2,5, 5, 10 und 20 min lang inkubiert. Zur Kontrolle wurden Zellen 20 min lang nur mit IBMX inkubiert. Die Werte sind Mittelwerte von Dreifachansätzen \pm S.D.

Abb. 12: Dosis-Wirkungs-Beziehung zwischen der Konzentration hPTH-(1-33), hPTH-(1-37) und hPTH-(1-38) und intrazellulärem cAMP-Spiegel in PC-12-Zellen nach 5 min Stimulation. $2,2 \times 10^5$ PC-12-Zellen wurden 5 min lang mit jeweils 10^{-11} (Doppelansatz), 10^{-10} , 10^{-9} , 10^{-8} und 10^{-7} M hPTH-(1-33), hPTH-(1-37) und hPTH-(1-38) in Dreifachansätzen in Gegenwart von 10^{-4} M IBMX inkubiert und

die intrazelluläre cAMP-Konzentration gemessen. IBMX-Kontrollwerte ohne PTH-Fragmente: 18,0, 26,1, 20,9. Die abgebildeten Werte sind Mittelwerte \pm S.D.

Abb. 13: UV-Zirkular-Dichroismus-Spektren der PTH-Fragmente hPTH-(1-33), hPTH-(1-37) und hPTH-(1-38). Im Vergleich zu anderen hPTH-Fragmenten weist das hPTH-(1-37) eine besonders prominente Struktur auf.

Abb. 14: Aufreinigung des chemisch synthetisierten hPTH-(1-37) im ersten Schritt. Hier wurde für das Rohprodukt eine Kationen-Austauscher-Chromatographie durchgeführt. Nach der Referenz erscheint das synthetische hPTH-(1-37) in dem größeren Peak bei einer Retentionszeit von 29 min (Pfeil).

Säule: Parcosil PepKat 300-7, 125 x 4 mm

Temperatur: 25° C

Elutionsmittel: A: 5 mM NaH_2PO_4

B: 5 mM NaH_2PO_4 1 M NaCl, pH = 3,0

Gradient: Start - 5 % B

57 min - 100 % B

Absorption: 230 nm

Flußrate: 1 ml/min

Abb. 15: Reversed-Phase-HPLC-Chromatographie des vorgereinigten Materials aus Abbildung 14 im semipräparativen Maßstab. Man erhält einen ab 22,50 min eluierenden Hauptpeak, der der Referenz des hPTH-(1-37) entspricht.

Säule: Parcosil ProRP 300-7, C 4, 100 x 20 mm

Temperatur: 25° C

Absorption: 230 nm

Elutionsmittel: A: 0,1 % Trifluoressigsäure

B: wie A + 80 % Acetonitril

Gradient: 0 - 100 % B in 60 min

Flußrate: 7 ml/min

Abb. 16: Reversed-Phase-HPLC-Chromatographie des Materials aus Abbildung 15 mit Darstellung der Endreinigung. Der Peak entspricht der Referenz von chemisch synthetisiertem hPTH-(1-37).

Säule: Parcosil ProRP, 300-7, C 18, 125 x 4 mm

Temperatur: 25° C

Absorption: 230 nm

Elutionsmittel: A: 0,1 % Trifluoressigsäure

B: wie A + 80 % Acetonitril

Gradient: 0 - 100 % B in 60 min

Flußrate: 0,7 ml/min

Abb. 17: Plasmadesorptionsmassenspektrum des synthetischen hPTH-(1-37) aus der Präparation von Abbildung 16. Das gefundene Molekulargewicht von MG 4398,1 stimmt im Fehlerbereich < 0,1 % mit der theoretisch berechneten Masse von MG 4401,0 des Moleküls überein. Nebensequenzen sind nicht sichtbar. Der Peak bei MG 2201,5 entspricht der doppelt ionisierten Form, ebenfalls innerhalb der Fehlergrenze der Messung. Diese Massenbestimmung wurde durch Gegensequenzierung bestätigt.

Beispiel 1

Indirekter Nachweis der Sequenz eines zirkulierenden,
biologisch aktiven PTH-Fragments

Als Ausgangsmaterial wurde Hämofiltrat verwendet, das in großen Mengen bei der Behandlung niereninsuffizienter Patienten anfällt und alle Plasmabestandteile bis zu einer Molekülgröße von ca. 20.000 Dalton enthält.

I. Gewinnung des Rohpeptidmaterials

Das Hämofiltrat wurde mittels einer Hämofiltrationsanlage der Firma Sartorius unter Verwendung von Cellulosetriacetat-Filtern mit einer Ausschlußgröße von 20.000 Dalton (Typ SM 40042, Sartorius, Göttingen, BRD) gewonnen. Das Filtrat stammte von niereninsuffizienten Patienten, die sich durch Langzeit-Hämofiltration in einer stabilen Stoffwechsellage befanden. 1000 l Hämofiltrat wurden gewonnen und unmittelbar nach der Gewinnung mittels Durchlauferhitzung, Ansäuern und Zugabe von Enzyminhibitoren gegen proteolytischen Abbau geschützt. Anschließend wurde durch Alginsäureextraktion nach dem Verfahren von Forssmann der DE 36 33 797 A1 eine Rohpeptidfraktion (ca. 100 g) gewonnen.

II. Isolierung einer Fraktion (Code 51.5) mit Immunreaktivität in mittelregional- und C-terminal-spezifischen Radioimmunoassays für Parathormon (PTH)

1. Entsalzen des Rohpeptidmaterials über Sephadex G-25

Die Rohpeptidfraktion aus der Alginsäure-Extraktion wurde über eine mit Sephadex G-25 (Pharmacia, Uppsala, Schweden) gefüllte Säule, die mit 1 M Essigsäure equilibriert war, bei 8° C gelchromatographisch aufgetrennt (Abb. 1).

Die Immunreaktivität in den Pools I bis IV wurde in einem Radioimmunoassay (RIA) für humanes PTH mit mittelregionaler Spezifität [hPTH-(44-68)-RIA, Fa. Immundiagnostik, Darmstadt, BRD] gemessen. Nach den Angaben des Herstellers beträgt die untere Nachweisgrenze 6 fMol/Test des verwendeten Standards [hPTH-(44-68)]. Intra-Assay- bzw. Inter-Assay-Variationskoeffizienten liegen bei 10 bis 13 % bzw. 12 bis 21 %. Die synthetischen hPTH-Peptide hPTH-(1-34), hPTH-(28-48) und hPTH-(64-84) zeigen keine Kreuzreaktion, die Peptide hPTH-(53-84) und hPTH-(1-84) 100 % Kreuzreaktion im hPTH-(44-68)-RIA.

Pool I enthielt die gesamte im hPTH-(44-68)-RIA gemessene Immunreaktivität, während in den anderen Fraktionen keine Immunreaktivität nachzuweisen war.

Pool I enthielt auch die höchste C-terminale Immunreaktivität, gemessen im hPTH-(53-84)-RIA (Fa. Immundiagnostik, Darmstadt, BRD). Der hPTH-(53-84)-RIA hat nach Herstellerangabe eine untere Nachweisgrenze von 4 fMol/Test des verwendeten Standards [hPTH-(53-84)]. Die Intra-Assay- bzw. Inter-Assay-Variationskoeffizienten liegen bei 8,3 bis 9,8 bzw. 11 bis 14 %. Die synthetischen hPTH-Peptide hPTH-(1-34), hPTH-(28-48) und hPTH-(44-68) zeigen keine Kreuzreaktion, die Peptide hPTH-(64-84) und hPTH-(1-84) 100 % Kreuzreaktion im hPTH-(53-84)-RIA.

Pool I (schraffiert) wurde für die weitere Isolierung eingesetzt, da hier aufgrund der Messungen in zwei PTH-RIA die höchste Konzentration an C-terminalen PTH-Fragmenten auftrat.

2. Präparative Kationen-Austauscher-Chromatographie von Pool I

Eine weitere präparative Auftrennung erfolgte bei Raumtemperatur über eine Kationen-Austauschersäule (Abb. 2). Es wurden zusammengekommen ca. 6 g des Materials aus Pool I in 12 identischen Chromatographieläufen aufgetrennt und die Immunreaktivität im hPTH-(44-68)-RIA verfolgt (Abb. 2). Die in der Tabelle nicht gezeigten Fraktionen 2-5 (schraffiert) enthielten die höchste Immunreaktivität im hPTH-(44-68)-RIA und wurden für die weitere Auftrennung gepoolt. Sie enthielten auch die höchste Immunreaktivität im hPTH-(53-84)-RIA.

3. Semipräparative Reversed-Phase-Chromatographie des immunoreaktiven Pools aus der präparativen Kationen-Austauscher-Chromatographie (Stufe 2)

Der immunreaktive Pool (ca. 200 mg) wurde über eine semipräparative Reversed-Phase (RP)-Chromatographie bei 45° C weiter gereinigt (Abb. 3). Die Immunreaktivität im hPTH-(53-84)-RIA (Abb. 3) bzw. im hPTH-(44-68)-RIA (Abb. 3) trat in zwei unvollständig voneinander getrennten Peaks auf.

Die Aufarbeitung des hinteren, im RIA stärker reagierenden Pools wird im folgenden genauer geschildert (Abb. 4 bis 6) und führte nach Durchlaufen der Stufen 4 bis 6 zu der Fraktion 51.5, die einer Sequenzanalyse zugeführt wurde.

Die nicht aufgeführten Fraktionen enthielten keine meßbare Immunreaktivität.

4. a) Semipräparative Kationen-Austauscher-Chromatographie des immunreaktiven Pools aus der semipräparativen RP-Chromatographie (Stufe 3)

Der hintere immunreaktive Pool aus der vorhergehenden RP-Chromatographie wurde über eine semipräparative Kationen-Austauschersäule bei Raumtemperatur chromatographiert (Abb. 4) und die mittelregionale und C-terminale PTH-Immunreaktivität (ohne Abb.) erschien in den Fraktionen 32-33. Diese wurden gepoolt (Schraffur) und weiterverarbeitet. Die nicht aufgeführten Fraktionen enthielten keine meßbare Immunreaktivität.

b) Analytische RP-Chromatographie des immunreaktiven Pools aus 4a)

Der immunreaktive Pool aus der vorhergehenden semipräparativen Kationen-Austauscher-Chromatographie wurde bei 45° C über eine analytische RP-Säule aufgetrennt (Abb. 5). Der hintere immunreaktive Pool mit höherer Immunreaktivität (schraffiert) wurde weiterverarbeitet. Die nicht aufgeführten Fraktionen enthielten

keine meßbare Immunreaktivität.

c) Analytische Kationen-Austauscher-Chromatographie des immunreaktiven Pools aus 4b)

Der immunreaktive Pool wurde über eine analytische Kationen-Austauschersäule bei Raumtemperatur chromatographiert (Abb. 6). Die Immunreaktivität im hPTH-(44-68)-RIA ist in Abbildung 6 zu sehen (schraffiert), die Messung im hPTH-(53-84)-RIA ergab wiederum das gleiche Bild. Die nicht aufgeführten Fraktionen enthielten keine meßbare Immunreaktivität. Die Fraktionen mit der höchsten Immunreaktivität wurden gepoolt (Schraffur) und weiterverarbeitet.

5. Hydrophobe Interaktionschromatographie des immunreaktiven Pools aus 4c)

Der immunreaktive Pool aus 4c) wurde mit Hilfe der hydrophoben Interaktionschromatographie bei Raumtemperatur weiter aufgetrennt (Abb. 7) und die Immunreaktivität im hPTH-(44-68)-RIA gemessen (Abb. 7). Die nicht aufgeführten Fraktionen enthielten keine meßbare Immunreaktivität. Die Fraktionen mit höchster Immunreaktivität (schraffiert) wurden gepoolt und der Endreinigung zugeführt.

6. a) Erste analytische RP-Chromatographie

Der immunreaktive Pool aus 5) wurde über eine RP-Säule bei 25° C chromatographiert und die Immunreaktivität mit dem hPTH-(44-68)-RIA verfolgt (Abb. 8). Die schraffiert angegebenen Fraktionen wurden rechromatographiert.

b) Zweite analytische RP-Chromatographie

Der immunreaktive Pool aus 6a) wurde nochmals über eine RP-Säule gegeben (Abb. 9). Mit Ausnahme der Temperatur, die bei dieser Chromatographie 45° C betrug, wurde unter den gleichen Bedingungen wie bei Stufe 6a) chromatographiert. Das Material des höheren Peaks mit der Code-Nr. 51.5 wurde sequenziert.

III. Isolierung einer zweiten Fraktion (Code 54.5) mit Immunreaktivität in mittelregional- und C-terminal-spezifischen Radioimmunassays für Parathormon (PTH)

Bei der Isolierung der Fraktion 51.5 traten bei der semipräparativen RP-Chromatographie (Stufe 3) 2 Pools mit Immunreaktivität auf. Die Aufarbeitung des vorderen Pools aus Stufe 3 erfolgte in identischer Weise wie für den hinteren Pool unter II. 4 bis 6 beschrieben. In Stufe 4b) wurden wiederum zwei immunreaktive Peaks gesehen, wobei in diesem Fall der vordere Peak überwog und weiterverarbeitet wurde. Nach Durchlaufen der Stufen 4c) bis 6b) wurde eine Fraktion mit dem Code 54.5 erhalten, die ebenfalls einer Sequenzanalyse zugeführt wurde.

IV. Sequenzierung der aus Hämofiltrat isolierten PTH-Peptide mit Immunreaktivität in mittelregional- und C-terminal-spezifischen Radioimmunoassays für Parathormon (PTH)

Die Fraktionen 51.5 und 54.5, deren Isolierung aus Hämofiltrat unter II und III beschrieben wurde, wurden mit Hilfe des Gasphasensequenzators Typ 470 A (Applied Biosystems) sequenziert. Der EDMAN-Abbau (*Edman und Begg, Eur. J. Biochem. 1, 80-91, 1967*) erfolgte mit dem Standardprogramm PTHRUN. Die Analyse der derivatisierten Aminosäuren wurde im on-line-Verfahren über einen ABI 120 A Chromatographen unter Verwendung des Standardprotokolls ABI durchgeführt.

Für die Fraktion 51.5 konnte eine Sequenz von 39 Aminosäuren bestimmt werden, weitere 5 Aminosäure-Reste konnten nur mit Vorbehalt ermittelt werden. Die gefundene Sequenz entspricht dem Abschnitt (38-76) des humanen PTH (*Keutmann et al., Biochemistry* 17, 5723-5729, 1978).

Für die Fraktion 54.5 konnte eine Sequenz von 16 Aminosäuren bestimmt werden. Die gefundene Sequenz entspricht dem humanen PTH-(38-53).

Aus dem menschlichen Hämofiltrat konnten zwei Fraktionen isoliert werden, die beide sowohl in einem mittelregionalen als auch in einem C-terminalen PTH-RIA detektiert wurden. Beide Peptide beginnen mit der aminoterminalen Sequenz Gly-Ala-Pro-Leu-Ala-Pro-Arg- usw., d.h. beide Peptide beginnen mit der Aminosäure 38 des hPTH-Moleküls. Die letzte C-terminale Aminosäure kann für beide gefundenen Peptide nicht mit Sicherheit angegeben werden. Im Fall der Fraktion 51.5 konnte fast bis zur Position 84 durchsequenziert werden. Das andere Peptid, von dem wegen der geringeren zur Verfügung stehenden Menge nur 16 Positionen durch Sequenzanalyse bestimmt werden konnten, hat mindestens eine Sequenzlänge von 30 Aminosäuren, da es sonst nicht im C-terminalen RIA detektiert würde. C-terminale PTH-Peptide mit einem anderslautenden N-terminalen Sequenzanfang konnten nicht isoliert werden. Diese Befunde lassen den Schluß zu, daß das hPTH-(1-84) zwischen den Aminosäuren 37 und 38 gespalten wird, und daß dabei das biologisch aktive PTH-Fragment hPTH-(1-37) entsteht.

Beispiel 2

Synthese des humanen Parathormon-Peptids hPTH-(1-37)

1. Synthese des kieselgurverstärkten Fmoc-Leu-Harzes

Das Fmoc-Aminosäureanhydrid (5 Äquivalente) wurde in einem Minimalvolumen N,N-Dimethylformamid (DMF) gelöst und in einem Rundkolben zu dem Hydroxymethylphenoxyacetyl-norleucin-Harz hinzugefügt. 4-Dimethylaminopyridin (1 Äquivalent) wurde ebenfalls in einem Minimalvolumen DMF gelöst und in den Rundkolben gegeben. Nach 1 Stunde Reaktionszeit wurde der Überschuß der Reagentien durch Filtration entfernt und das Harz auf einem Filter gründlich gewaschen.

2. Strategie der Synthese des humanen Parathormon-Peptids hPTH-(1-37)

Für die Synthese des Peptids mit der Formel

Ser-Val-Ser-Glu-Ile-Gln-Leu-Met-His-Asn-Leu-Gly-Lys-His-Leu-Asn-Ser-Met-Glu-Arg-Val-Glu-Trp-Leu-Arg-Lys-Lys-Leu-Gln-Asp-Val-His-Asn-Phe-Val-Ala-Leu

wurde die Durchflußmethode (*Atherton und Sheppard, Solid phase peptide synthesis. IRL Press, Oxford, 1989*) angewendet. Die genannte Peptidsequenz wurde mit Hilfe einer automatischen Peptidsynthese-Apparatur (Milligen 9050) unter Verwendung der Fmoc-Pentafluorophenylester (OPfp) synthetisiert. Folgende Fmoc-Aminosäuren-OPfp wurden im Überschuß (4 Äquivalente) eingesetzt (verwendet wurden jeweils die Derivate der L-Aminosäuren):

| | |
|----------------------------------|-----------------------------|
| Fmoc-Ala-OPfp | Fmoc-Ala |
| Fmoc-Asp(OBu ^t)-OPfp | Fmoc-Asp(OBu ^t) |
| Fmoc-Met-OPfp | Fmoc-Met |
| Fmoc-Glu(OBu ^t)-OPfp | Fmoc-Glu(OBu ^t) |
| Fmoc-His(Trt)-OPfp | Fmoc-His(Trt) |
| Fmoc-Leu-OPfp | Fmoc-Leu |
| Fmoc-Arg(Mtr)-OPfp | Fmoc-Arg(Mtr) |
| Fmoc-Trp-OPfp | Fmoc-Trp |

| | |
|----------------------------------|----------------------------|
| Fmoc-Lys(BOC)-OPfp | Fmoc-Lys(BOC) |
| Fmoc-Ile-OPfp | Fmoc-Ile |
| Fmoc-Phe-OPfp | Fmoc-Phe |
| Fmoc-Gly-OPfp | Fmoc-Gly |
| Fmoc-Asn-OPfp | Fmoc-Asn(Trt) |
| Fmoc-Gln-OPfp | Fmoc-Gln(Trt) |
| Fmoc-Val-OPfp | Fmoc-Val |
| Fmoc-Ser(Bu ^t)-ODhbt | Fmoc-Ser(Bu ^t) |

Die Synthese kann auch mit Hilfe von *in situ* durch Zugabe von TBTP [O-(1H-Benzotriazol-1-yl)-N,N,N',N'-tetramethyluronium-tetrafluoroborat] gebildeten Hydroxybenzotriazolestern durchgeführt werden.

Das Peptid wurde vom Trägerharz durch Zugabe einer Mischung von Trifluoressigsäure-Anisol-Ethandithiol-Phenol 94:2:2:2 (v/v/v/w) abgespalten und mit Ether gefällt. Das HPLC-gereinigte Peptid wurde mit Hilfe von Aminosäureanalyse, analytischer HPLC und Aminosäuresequenzanalyse charakterisiert.

3. Praktische Durchführung der Synthese des humanen Parathormon-Peptids hPTH-(1-37)

Die Synthese von

Ser-Val-Ser-Glu-Ile-Gln-Leu-Met-His-Asn-Leu-Gly-Lys-His-Leu-Asn-Ser-Met-Glu-Arg-Val-Glu-Trp-Leu-Arg-Lys-Lys-Leu-Gln-Asp-Val-His-Asn-Phe-Val-Ala-Leu (I) hPTH-(1-37)

wurde mit dem automatischen 9050 PepSynthesizer (Programm Version 1.3), MilliGen/Bioscience, nach der continuous flow-Methode durchgeführt. Fmoc-Aminosäurepentafluorophenylester waren L-konfiguriert und in 0,8 mmol-Portionen verwendet. Alle zur Synthese notwendigen Reagenzien wurden von MilliGen/Bioscience bezogen: N,N-Dimethylformamid, 20 % Piperidin in N,N-

Dimethylformamid und 1-Hydroxybenzotriazol. Die L-Aminosäurederivate wurden in vierfachem Überschuß eingesetzt. Die terminalen Aminogruppen waren Fmoc-geschützt. Asparagin- und Glutaminsäure wurden als N^W-tert-butylester, Tyrosin und Serin als tert-butylether, Histidin und Lysin als N^W-Boc-Verbindungen und Arg als N^G-2,2,5,7,8-pentamethylchroman-6-sulfonyl(Pmc)-Derivat eingesetzt. Die Synthese wurde ausgehend vom Kieselgur-Harz Fmoc-Leu-Pepsyn KA (MilliGen/Bioscience), also mit trägergebundener C-terminaler Aminosäure (0,091 meq Leu/g, 1,60 g) durchgeführt. Die Acylierung von Fmoc-Arg(Pmc)-OH wurde unter Anwesenheit von O-(1H-Benzotriazol-1-yl)-N,N,N',N'-tetramethyluronium-tetrafluoroborat (TBTU), 1-Hydroxybenzotriazol und Diisopropylethylamin durchgeführt. Folgender Synthesecyclus wurde verwendet: Fmoc-Abspaltung mit 20 % Piperidin in DMF (7 min), waschen mit DMF (12 min), Acylierung (30 min; bei Fmoc-Val-OPfp 45 min), und waschen mit DMF (8 min). Die fortschreitende Synthese wurde durch kontinuierliche UV-Detektion verfolgt. Die Synthese wurde mit der Abspaltung des N-terminalen Fmoc-Restes abgeschlossen. Das harzgebundene Peptid wurde dreimal mit je 50 ml Isopropanol, Eisessig, Isopropanol und Diethylether gewaschen und getrocknet.

Die Abspaltung vom Harz erfolgte mit Trifluoressigsäure/Phenol/Ethandithiol/Thioanisol/Wasser 10 : 0,75 : 0,25 : 0,5 : 0,5 (v/w/v/v/v, 5 ml). Die Lösung wird *in vacuo* eingengt und das Produkt durch Zugabe von Diethylether ausgefällt. Das erhaltene Rohpeptid wird mehrere Male mit Diethylether gewaschen und getrocknet. Aus 240 mg Peptid-Harz werden so 65 mg Rohpeptid erhalten.

Die Reinigung erfolgte unter Benutzung eines in unabhängiger Synthese hergestellten Standards von hPTH-(1-37), dessen korrekte Sequenz durch MS (Massenspektrometrie) und Sequenzanalyse bestätigt war. Im ersten Schritt wurde das deblockierte Rohmaterial mit einer Kationen-Austauscher-HPLC gereinigt (Parcosil PepKat 2 x 10 cm, 300 Å, 7 µ, Flußrate 9 ml/min, 230 nm, Elutionsmittel A= 5 mM NaH₂PO₄; B= 5 mM NaH₂PO₄ + 1 M NaCl, Gradient: 5 % → 100 % in 60 min), wobei der Hauptpeak entsprechend der Referenzsubstanz bei 28,17 min

erscheint (Abb. 14). Im zweiten Reinigungsschritt bei gleichzeitiger RP-HPLC zur Entsalzung (Parcosil ProRP C4 2 x 10 cm, 300 Å, 7 µ, Flußrate 7 ml/min, 230 nm, Elutionsmittel A= 0,1 % Trifluoressigsäure in Wasser; B= 0,1 % Trifluoressigsäure in Acetonitril/Wasser 4:1, Gradient: 0 % → 100 % B in 60 min). Ausbeute: 6,6 mg (1,5 mmol, 14,8 %) wurde ein Peak bei 30,80 min erhalten (Abb. 15), der in einer analytischen RP-HPLC mit C18-Material einen scharfen einheitlichen Peak ergibt (Abb. 16).

Die Identität des synthetisierten Materials mit der vorgegebenen Primärstruktur von PTH-(1-37) wurde durch MS (Plasmadesorptionsmethode, Bio-Ion, Applied Biosystems) (Abb. 17) und Gegensequenzierung in einem Gassphasensequenzator (Modell 470, Applied Biosystems) nachgewiesen. Die biologische Aktivität des synthetischen PTH-(1-37) wurde im Funktionstest durch die differentielle Muskelkontraktion von Pulmonalarterien gegenüber der Arteria renalis nachgewiesen: dieser zeigte, daß das synthetische Material eine korrekte biologische Aktivität aufweist.

Beispiel 3

Nachweis des biologisch aktiven, zirkulierenden humanen PTH als hPTH-(1-37)

Wie in Beispiel 1 beschrieben, wurde Hämofiltrat chromatographisch aufgearbeitet, wobei das synthetische hPTH-(1-37) gemäß Beispiel 2 als Referenzsubstanz eingesetzt wurde (Abb. 10). Auf diese Weise konnte aus dem Hämofiltrat eine Fraktion nachgewiesen werden, die Immunreaktivität mit aminoregionaler Spezifität im hPTH-Radioimmunoassay zeigte. Diese Fraktion wurde in gleicher Weise wie in Beispiel 1 gereinigt und als hPTH-(1-37) charakterisiert. Dabei wurde nachgewiesen, daß mit der verwendeten Parcosil-RP-Säule hPTH-(1-37) eindeutig von weiteren

PTH-Fragmenten unterschieden werden kann (Abb. 10), nämlich hPTH-(1-33), hPTH-(1-34) und hPTH-(1-38).

Beispiel 4

Funktionelle Analyse von hPTH-(1-37) zum Nachweis seiner biologischen Aktivität

Veränderung des intrazellulären Spiegels von cyclischem 3',5'-Adenosinmonophosphat (cAMP) bei Phäochromozytomzellen (PC-12) der Ratte nach Applikation von humanen Parathormon-Peptiden hPTH-(1-33), hPTH-(1-37) und hPTH-(1-38).

In Vorversuchen wurde gezeigt, daß eine Phäochromozytomlinie der Ratte (PC-12) auf Zugabe von PTH mit einer Erhöhung des intrazellulären cAMP-Spiegels reagiert. Daraufhin wurde die Wirkung des synthetischen hPTH-Peptides (1-37) mit der Wirksamkeit anderer N-terminaler PTH-Fragmente [hPTH-(1-33) und hPTH-(1-38)] in diesem Zell-System verglichen.

Es wurde eine PC-12 Zell-Linie verwendet. Die Zellen wurden in RPMI-Medium 1640 (Gibco) mit 10 ml/L L-Glutamin 200 M (Gibco), 10 % Pferdeserum, 5 % FCS und 1 % Penicillin/Streptomycin kultiviert. Als Phosphodiesterase-Hemmer wurde 4-Isobutyl-1-methyl-xanthin (IBMX) von Sigma verwendet. Es wurden Kulturschalen mit 24 Löchern (Durchmesser 16 mm) (Costar), beschichtet mit Poly-L-Lysin, verwendet. Die Beschichtung erfolgte mit steril filtrierter Poly-L-Lysin-Lösung (100 mg/L) für 1 Stunde bei 37° C.

Es wurden die folgenden hPTH-Peptide untersucht:

hPTH-(1-33) (MW. 3971,2; Peptidgehalt 76,9 %), hPTH-(1-37) (MW. 4401,0;

Peptidgehalt 74,5 %) und hPTH-(1-38) (MW. 4458,0; Peptidgehalt 81,8 %).

Die Zellen wurden nach Ausbildung eines dichten Zellrasens (nach ca. 4-8 Tagen) verwendet. Die Inkubation erfolgte mit 1 ml Zellmedium bei Raumtemperatur. Die PTH-Peptide wurden unmittelbar vor Versuchsbeginn mit Zellmedium verdünnt. Im ersten Versuchsansatz wurden $1,5 \times 10^5$ Zellen mit 10^{-7} M hPTH-(1-33), hPTH-(1-37) und hPTH-(1-38) in Gegenwart von 10^{-4} IBMX 0, 2,5, 5, 10 und 20 Minuten lang inkubiert. Zur Kontrolle wurden Zellen 20 Minuten lang nur mit IBMX inkubiert. Die Werte sind Mittelwerte von Dreifachansätzen \pm S.D. (vgl. Abb. 11).

In einem zweiten Versuchsansatz wurden $2,2 \times 10^5$ PC-12-Zellen 5 Minuten lang mit jeweils 10^{-11} (Doppelansatz), 10^{-10} , 10^{-9} , 10^{-8} und 10^{-7} M hPTH-(1-33), hPTH-(1-37) und hPTH-(1-38) in Dreifachansätzen in Gegenwart von 10^{-4} M IBMX inkubiert und die intrazelluläre cAMP-Konzentration gemessen. IBMX-Kontrollwerte ohne PTH: 18,0, 26,1, 20,9. Die abgebildeten Werte sind Mittelwerte \pm S.D. (vgl. Abb. 12).

Der Zusatz von PTH und IBMX erfolgte gleichzeitig. Nach Absaugen des Mediums wurde die Reaktion durch Zusatz von 1 ml 99 % Ethanol gestoppt. Die Zellen wurden abgekratzt und mit dem Ethanol in Plastikröhrchen (Greiner) überführt. Die Kulturschale wurde mit 66 % Ethanol nachgespült, die Überstände vereinigt und zentrifugiert. Der Überstand wurde im Wasserbad (50° C) unter Stickstoffbegasung eingedampft. Die Konzentration des cAMP wurde mit Hilfe eines Radioimmunoassay-Kit (NEN) bestimmt. Die Messung erfolgte nach den vom Hersteller angegebenen Vorschriften. Die eingesetzten Mengen an cAMP-Standard, cAMP-Antiserum-Komplex, cAMP ^{125}I -Tracer-Konzentrat, cAMP-Trägerserum und cAMP-Präzipitator betrugen 50 % der vom Hersteller angegebenen Menge.

Die Ergebnisse zeigen, daß signifikante Unterschiede in der Wirksamkeit des hPTH-(1-37) im Vergleich zu anderen, nicht endogen vorkommenden PTH-Peptiden in dem

untersuchten Zellsystem bestehen. Dieses Ergebnis läßt auf Unterschiede in der Konformation dieser Peptide schließen, die sich, wie hier gezeigt, auf die Aktivierung des PTH-Rezeptor-Adenylatcyclase-Systems auswirken, darüber hinaus aber auch die Antigenität beeinflussen.

Beispiel 5

Untersuchungen zur Sekundärstruktur der Parathormon-Fragmente hPTH-(1-33), hPTH-(1-37) und hPTH-(1-38) durch Zirkular-Dichroismus

Die Messung des Zirkular-Dichroismus-Spektrums erfolgte mit einem Jasco J-500 Automatic Recording Spectropolarimeter gekoppelt mit einem Jasco DP-500 Data Processor. Zur Bestimmung der Sekundärstruktur wurde im Spektralbereich 190-240 nm, bei Raumtemperatur, in einer ausgewählten Quarzküvette, bei einem "light path" von 1 mm, gemessen. Die eingesetzte Parathormonkonzentration betrug 50 µg/ml hPTH-(1-33), 50 µg/ml hPTH-(1-37) und 50 µg/ml hPTH-(1-38). Zur Lösung wurde 10 mM TRIS-HCl-Puffer pH 7,5 verwendet. (Übrige Meßbedingungen: Empfindlichkeit, 2 milli Grad/cm; Zeitkonstante, 2 sek. Schreibergeschwindigkeit, 5 nm/min.; Wellenlängenexpansion, 5 nm/cm.) Die Kurven in der Abbildung 13 für hPTH-(1-33), hPTH-(1-37) und hPTH-(1-38) sind Mittelwerte der Signale von 4 aufeinander folgenden Messungen abzüglich der Basislinienwerte.

Die Auswertung zur Ermittlung der Sekundärstruktur erfolgte nach dem von *Reed und Kinzel (Biochemistry 23, 1357-1362, 1984)* beschriebenen Verfahren. Aus den vorhandenen Daten wurde für die Sekundärstruktur des hPTH-(1-38) ein α -Helix-Anteil von etwa 27 % errechnet. Das um eine Aminosäure kürzere PTH-Fragment [hPTH-(1-37)] dagegen weist einen deutlich höheren Anteil an α -Helix-Struktur von

etwa 40-45 % auf. Der Anteil an α -Helix beim hPTH-(1-33) ist wieder ähnlich niedrig wie beim hPTH-(1-38).

Aus den Untersuchungen folgt, daß bedingt durch die erheblichen Unterschiede in der Sekundärstruktur die Peptid-Rezeptor-Interaktionen und Immunoepitop-Eigenschaften des PTH-Fragments hPTH-(1-37) gegenüber den übrigen Fragmenten deutlich verschieden sein müssen.

Beispiel 6

Untersuchungen zur biologischen Aktivität von hPTH-(1-37) auf die glatte Muskulatur der Lungengefäße und des Corpus cavernosum (männliches Genitalorgan).

Die glatte Muskulatur der Lungengefäße und des Corpus cavernosum wurden aus menschlichen Operationspräparaten und bei Kaninchen gewonnen und in einem geeigneten Organbadsystem zur Messung der Kraftentwicklung eingespannt und untersucht. Es wurde festgestellt, daß diese Muskulatur gegenüber anderen glatten Muskeln des menschlichen Organismus nach Vorkontraktion mit verschiedenen kontraktionsaktivierenden Stoffen durch Zugabe des hPTH-(1-37) in Konzentrationen im Bereich von 10^{-9} Mol eine deutliche Relaxation zeigt, was beweist, daß das hPTH-(1-37) für die Vasorelaxation der Lungengefäße und die Durchblutungsaktivierung des männlichen Gliedes ein besonders geeignetes Peptid darstellt.

Patentansprüche

1. hPTH-Fragment-(1-37) mit der Aminosäuresequenz Ser - Val - Ser - Glu - Ile - Gln - Leu - Met - His - Asn - Leu - Gly - Lys - His - Leu - Asn - Ser - Met - Glu - Arg - Val - Glu - Trp - Leu - Arg - Lys - Lys - Leu - Gln - Asp - Val - His - Asn - Phe - Val - Ala - Leu sowie seine natürlichen und pharmakologisch verträglichen Derivate, insbesondere amidierte, acetylierte, phosphorylierte und glycosylierte hPTH-(1-37)-Derivate.
2. Verfahren zur Herstellung des hPTH-Fragmentes-(1-37) oder seiner Derivate nach Anspruch 1 dadurch gekennzeichnet, daß dieses über eine prokaryontische oder eine eukaryontische Expression hergestellt und chromatographisch gereinigt wird.
3. Verfahren zur Herstellung des hPTH-Fragmentes-(1-37) oder seiner Derivate nach Anspruch 1 dadurch gekennzeichnet, daß man es aus menschlichem Blut über übliche Chromatographie-Verfahren in bekannter Weise isoliert.
4. Verfahren zur Herstellung des hPTH-Fragmentes-(1-37) oder seiner Derivate nach Anspruch 1 dadurch gekennzeichnet, daß man das hPTH-Fragment-(1-37) durch die üblichen Verfahren der Festphasen- und Flüssigphasen-Synthese aus den geschützten Aminosäuren, die in der ausgegebenen Sequenz enthalten sind, herstellt, deblockiert und es mit den gängigen Chromatographie-Verfahren reinigt.
5. Arzneimittel, enthaltend das humane, zirkulierende Nebenschilddrüsenhormon nach Anspruch 1 oder hergestellt nach Ansprüchen 2 bis 4, das hPTH-Fragment-(1-37) als aktiven Wirkstoff neben üblichen Hilfs- und Zusatzstoffen.
6. Verwendung des Arzneimittels nach Anspruch 5 zur Behandlung von Erkrankungen der Nebenschilddrüse, insbesondere bei deren Unterfunktion (Hypoparathyreoidismus).

7. Verwendung des Arzneimittels nach Anspruch 5 zur Behandlung von degenerativen Knochenerkrankungen, insbesondere der Osteoporose.

8. Verwendung des Arzneimittels nach Anspruch 5 zur Behandlung von Knochenfrakturen in der Heilungsphase.

9. Verwendung des Arzneimittels nach Anspruch 5 zur Behandlung von Kreislauferkrankungen, die mit Erhöhung des Blutdruckes einhergehen, insbesondere der essentiellen Hypertonie.

10. Verwendung des Arzneimittels nach Anspruch 5 zur Behandlung von Lungenerkrankungen, die mit Erhöhung des Blutdruckes im kleinen Kreislauf einhergehen, insbesondere der primären pulmonalen Hypertonie.

11. Verwendung des Arzneimittels nach Anspruch 5 zur Behandlung von Nierenerkrankungen, die mit Störungen der Elektrolytausscheidung einhergehen, insbesondere bei der akuten Niereninsuffizienz sowie Phosphat- und Calcium-Ausscheidungsstörungen.

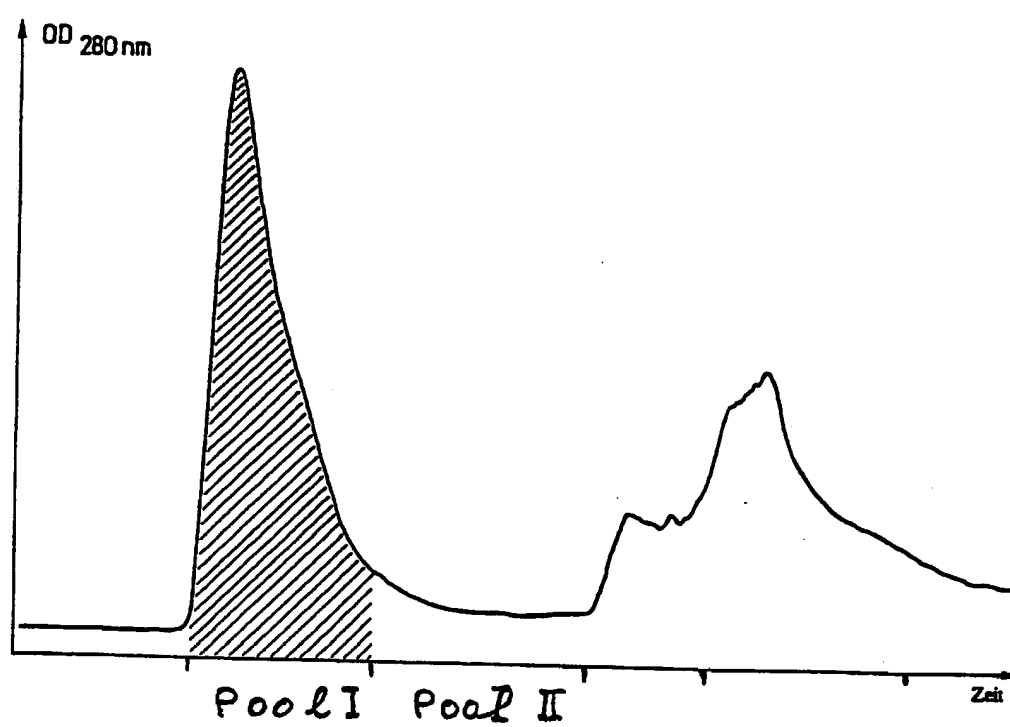
12. Verwendung des Arzneimittels nach Anspruch 5 zur Behandlung von akuten Erkrankungen, gemäß Ansprüchen 6 bis 11, indem es in geeigneter Form für die Behandlung in der Intensivpflege dieser Erkrankungen benutzt wird.

13. Verwendung des Arzneimittels nach Anspruch 5 zur Behandlung der männlichen Impotenz, in galenisch geeigneten, pharmazeutischen Zubereitungen, insbesondere in injizierbaren Lösungen, allein oder kombiniert mit anderen Peptiden wie Cardiodilatin/Urodilatin und/oder Calcitonin-Gen-Related-Peptide (CGRP) für die phasenweise Behandlung in der Fertilisationspflege und Impotenz, wobei das Peptid hPTH-(1-37) in Einzeldosen zwischen 1 und 10 Mikrogramm vorzugsweise in das männliche Glied appliziert wird.

14. Verwendung des Arzneimittels nach Anspruch 5 zur Diagnose von Erkrankungen, insbesondere nach irgendeinem der Ansprüche 6 bis 13, indem spezifische Antikörper gegen das synthetische Peptid hergestellt werden und die Blutkonzentration von hPTH-(1-37) über Immuntests gemessen wird.

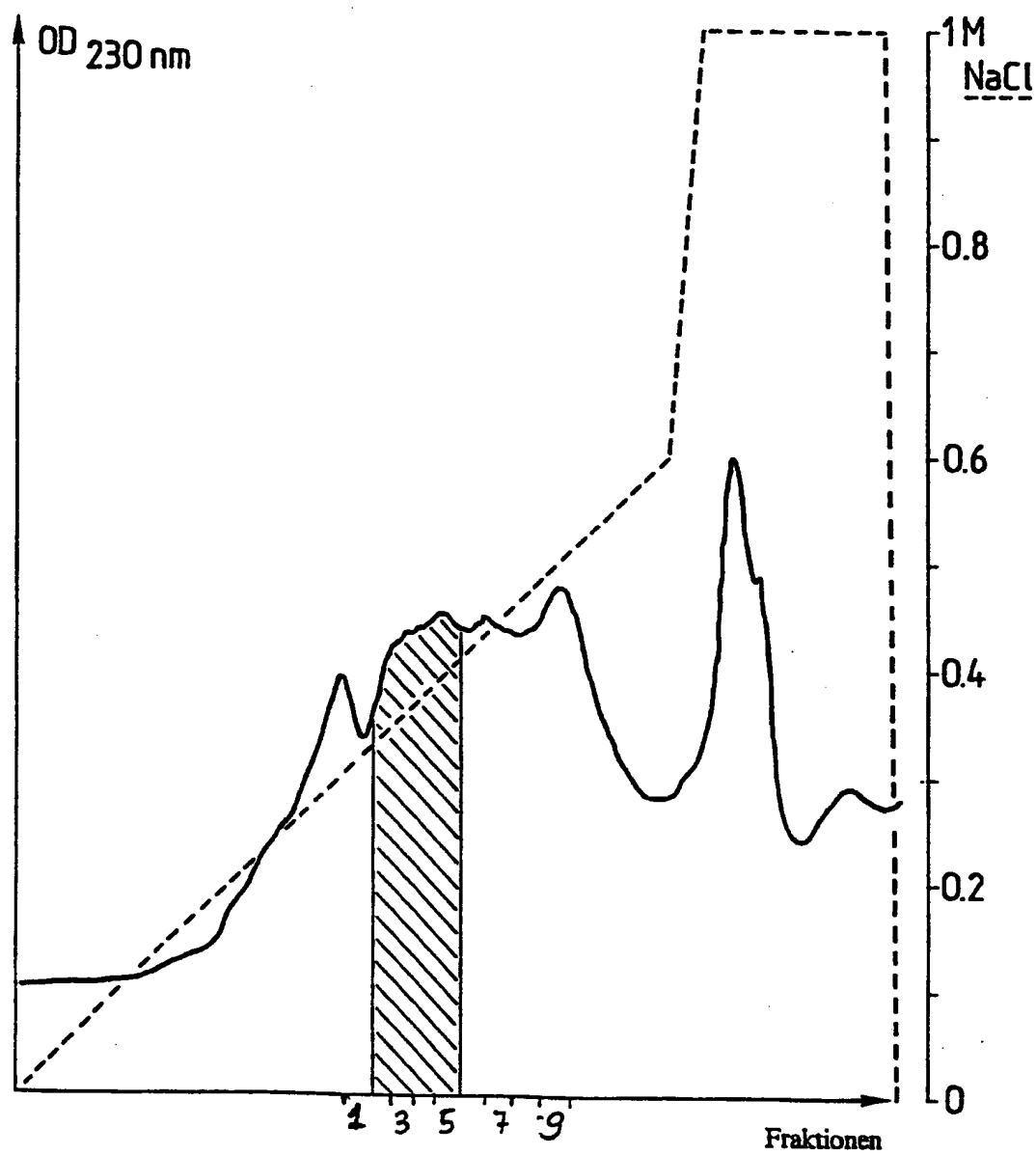
15. Verwendung des Arzneimittels nach Anspruch 5 in verschiedenen galenischen Applikationsformen, insbesondere der lyophilisierten, mit Mannit aufgenommenen Form in sterilen Ampullen zur Auflösung in physiologischer Kochsalzlösung und/oder Infusionslösungen zur wiederholten Einzelinjektion und/oder Dauerinfusion in Mengen von 300 Mikrogramm bis 30 Milligramm reines hPTH-(1-37) pro Therapie-Einheit.

Abbildung 1



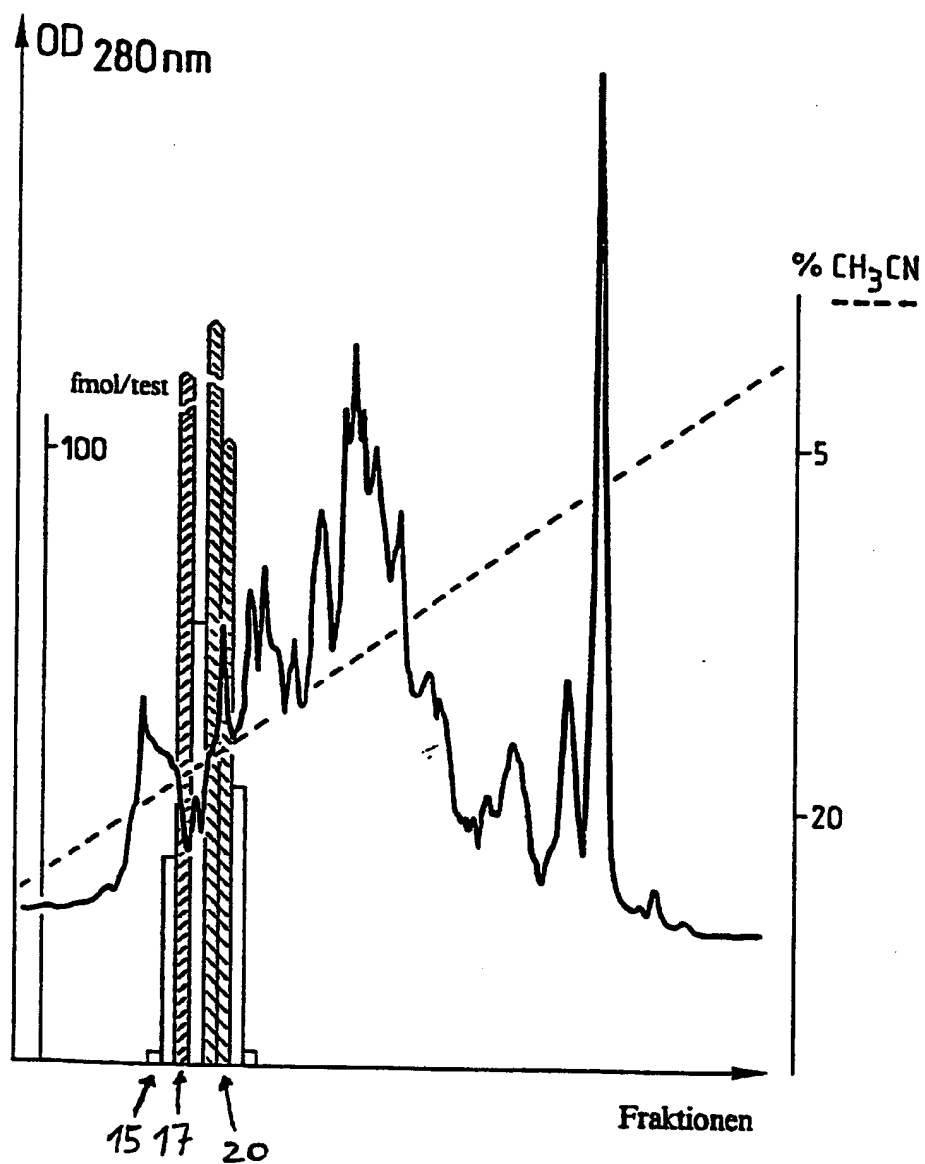
2/17

Abbildung 2



3/17

Abbildung 3



4/17

Abbildung 4

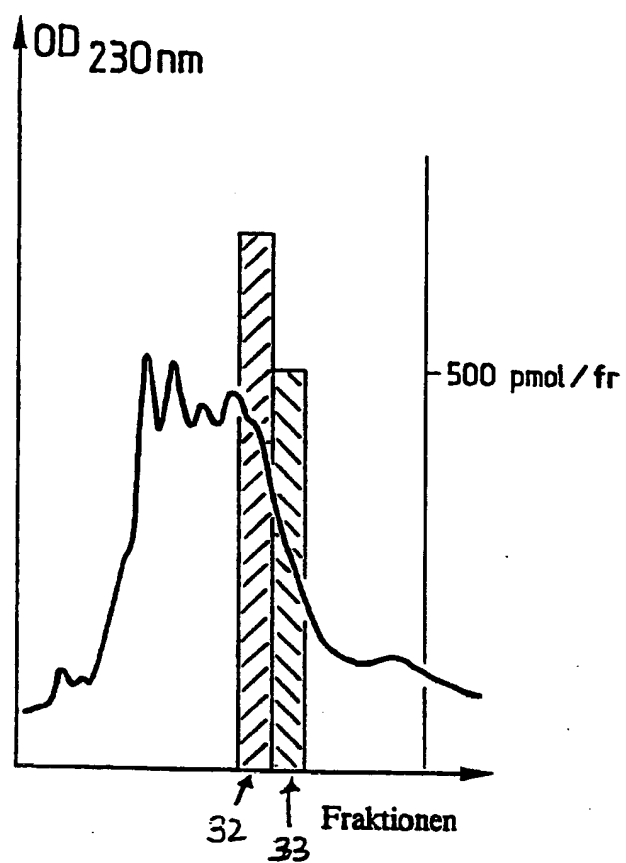
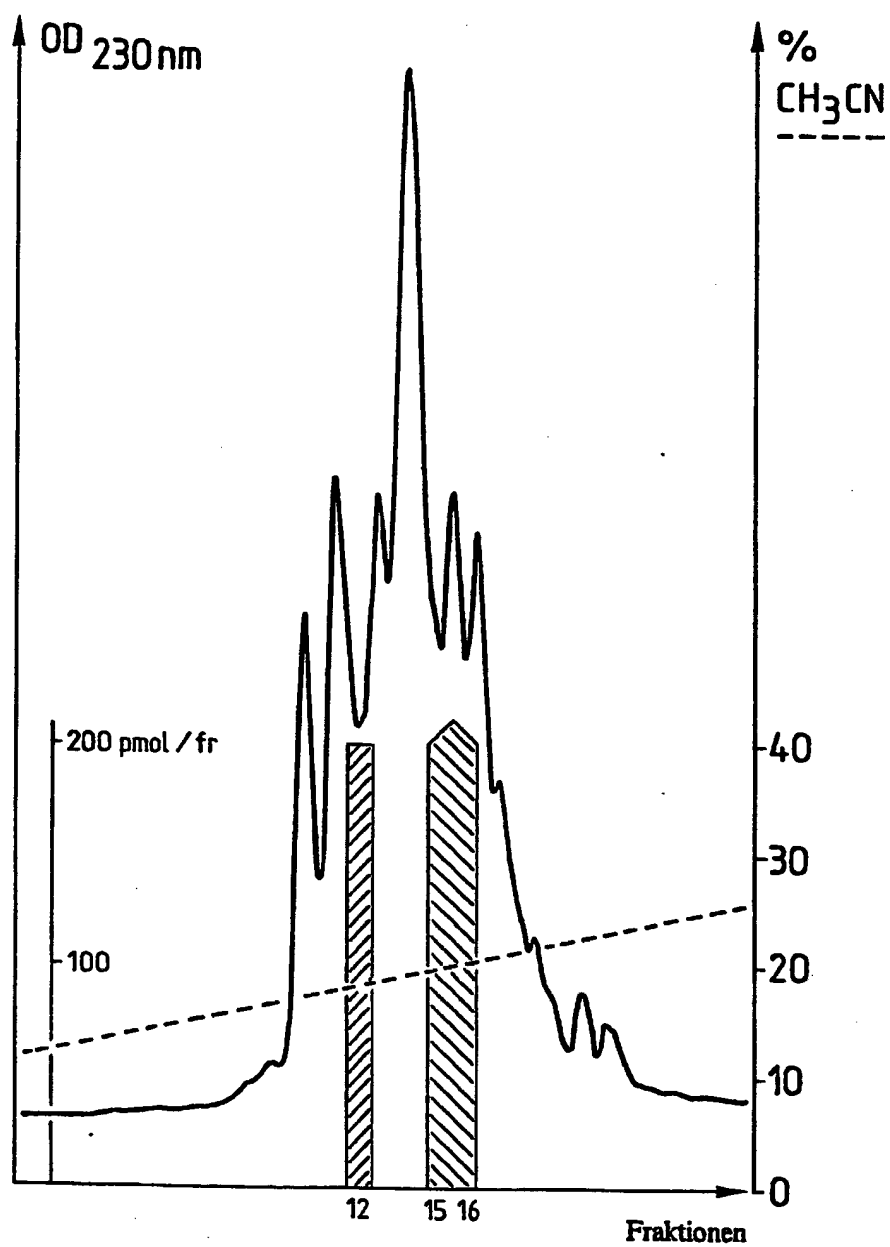


Abbildung 5



6/17

Abbildung 6

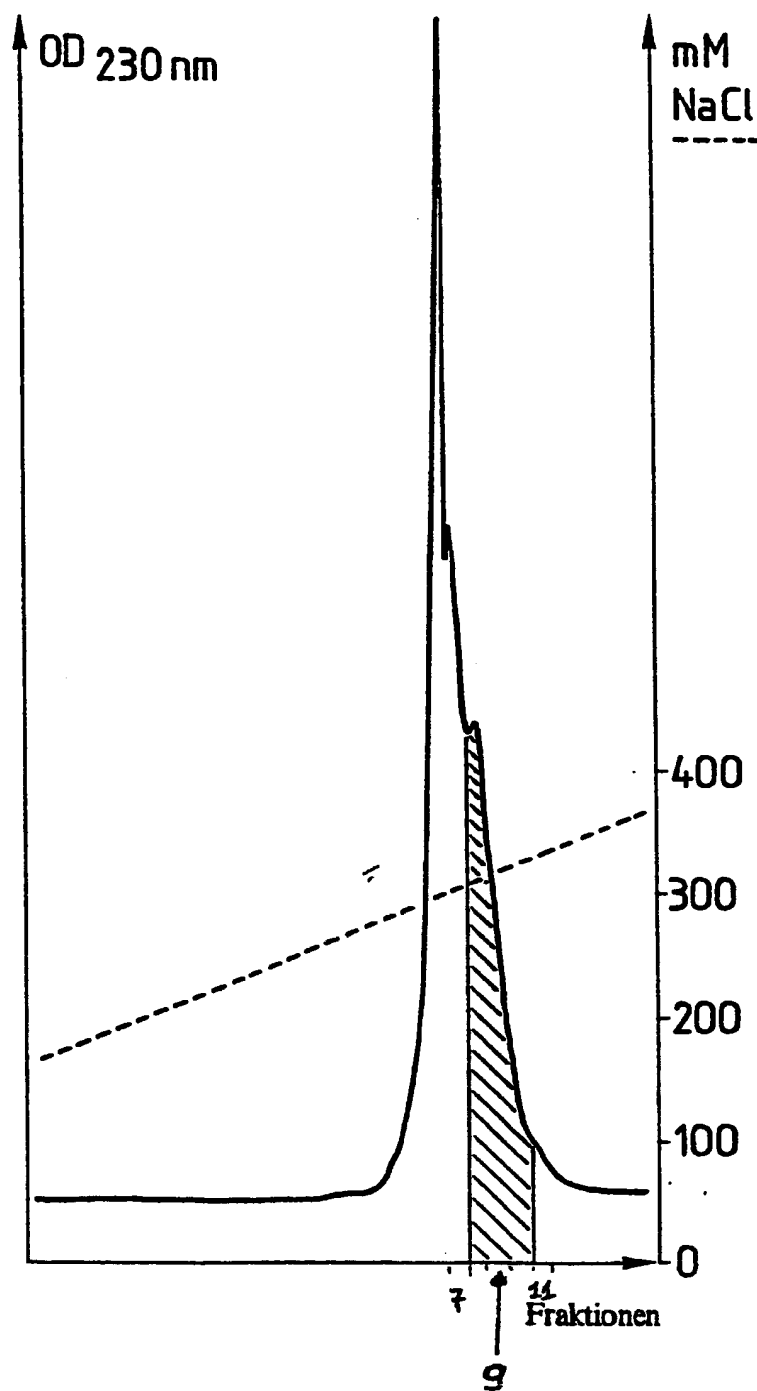


Abbildung 7

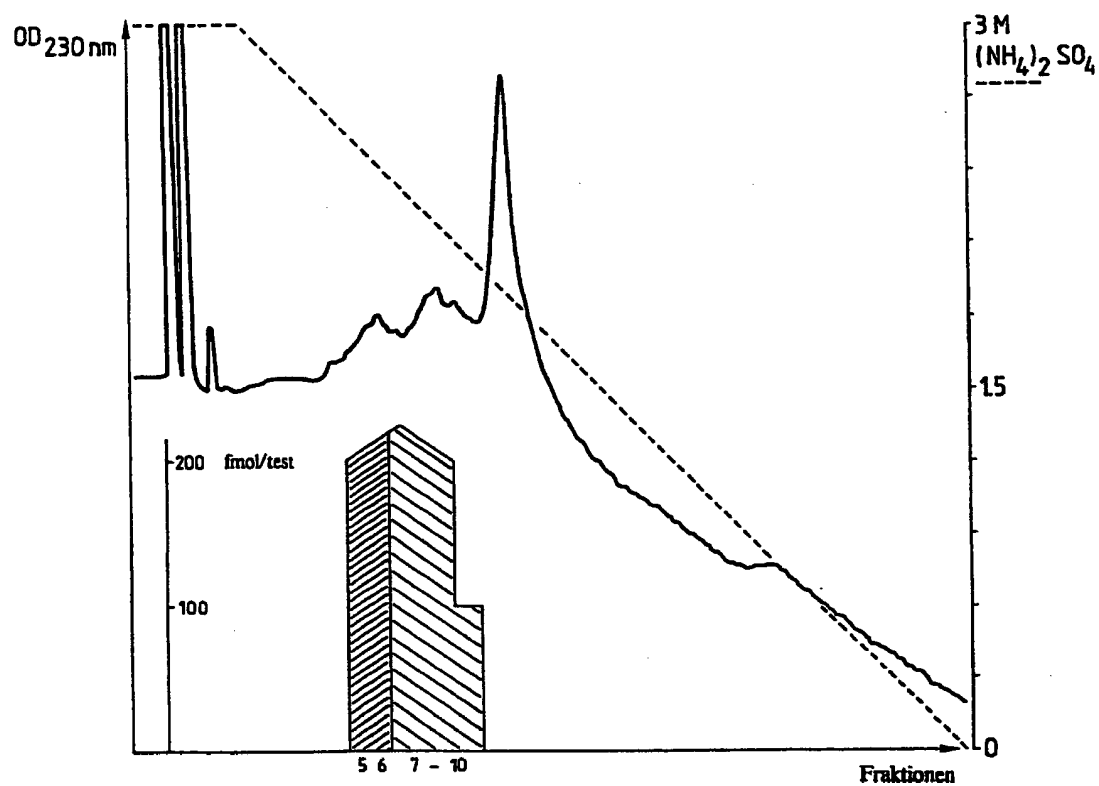


Abbildung 8

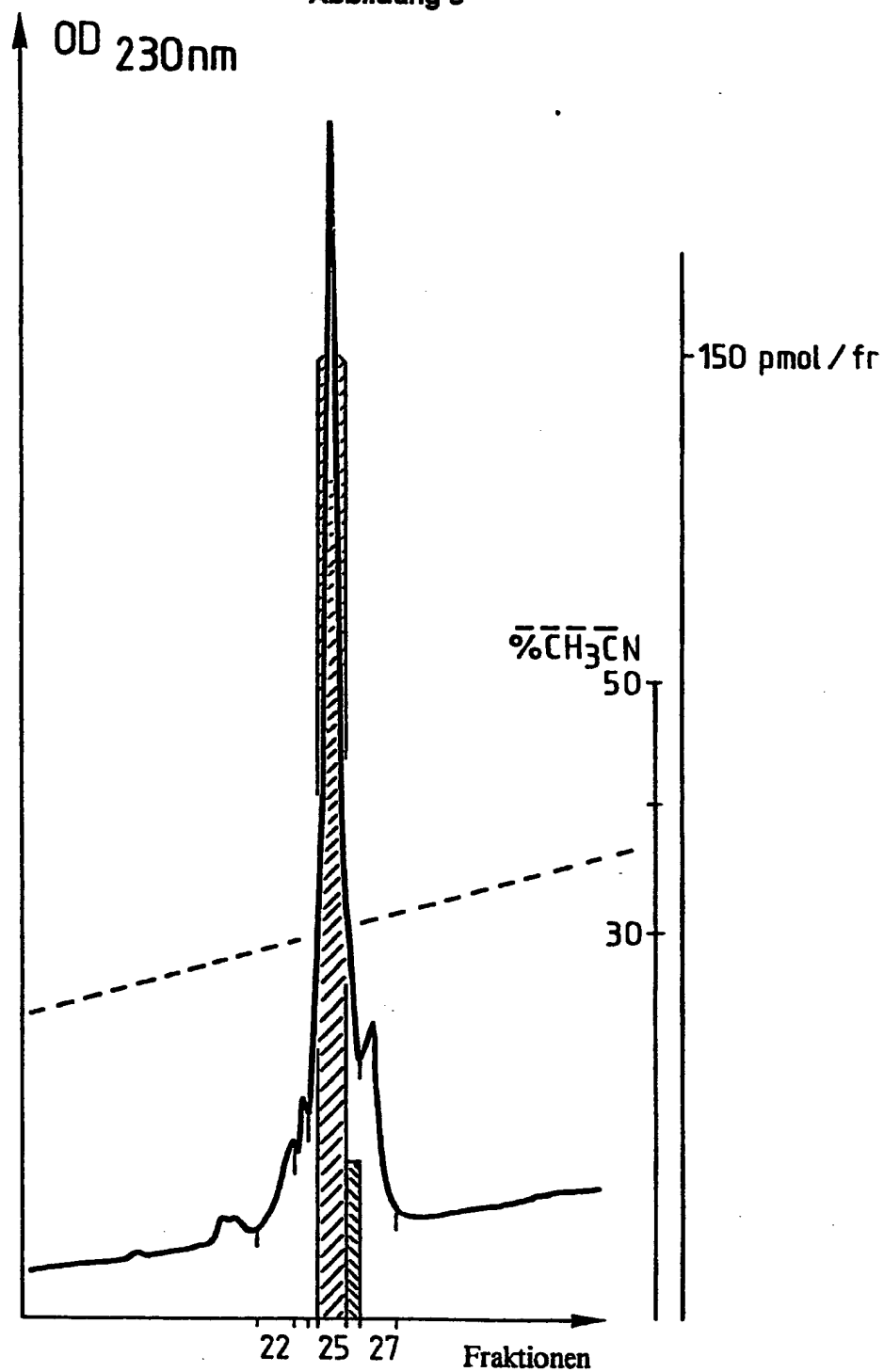


Abbildung 9

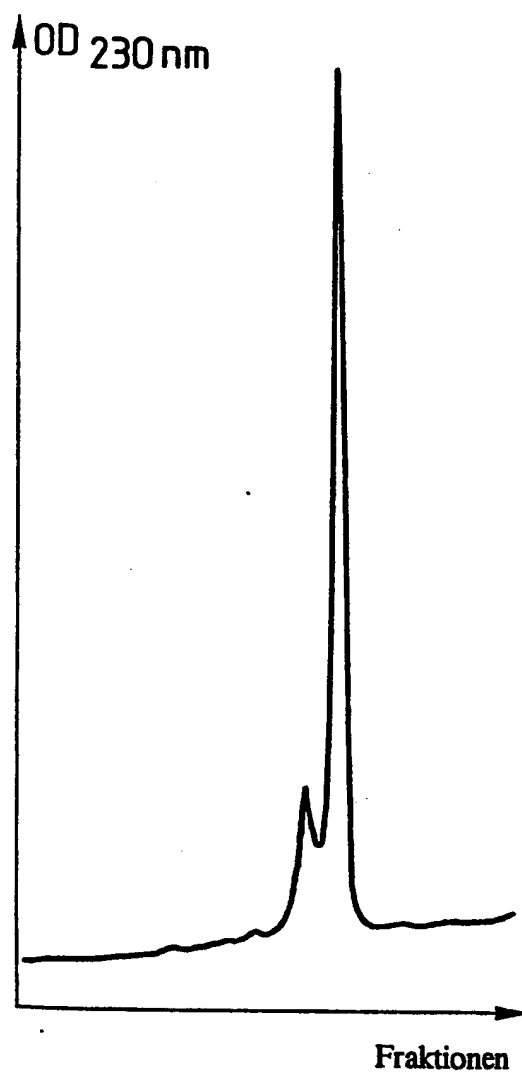
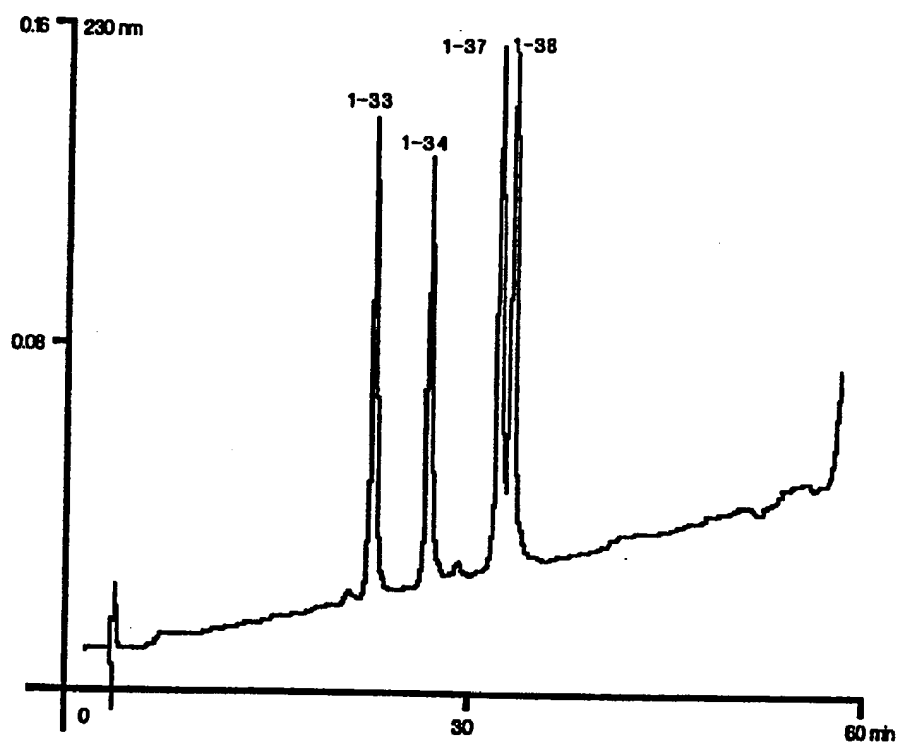
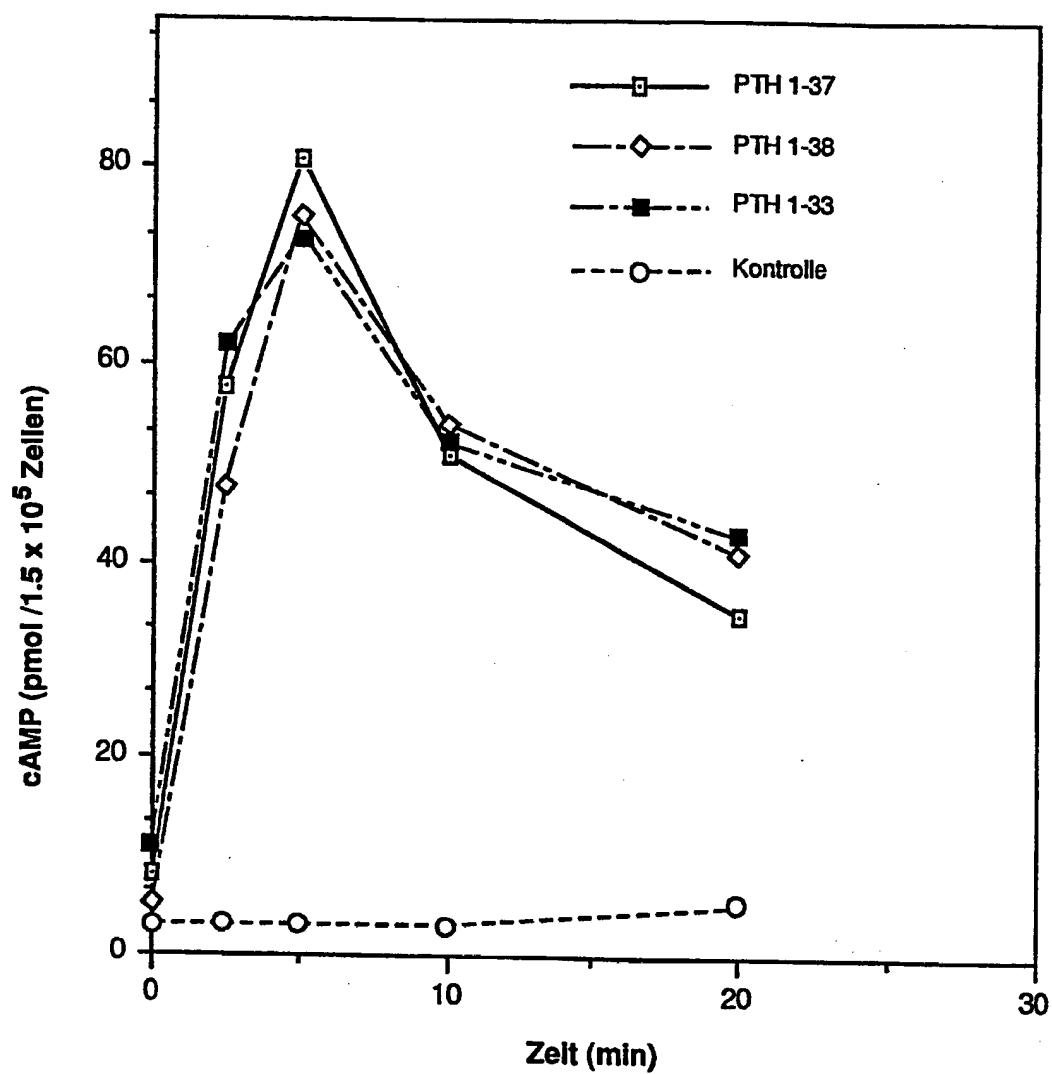


Abbildung 10



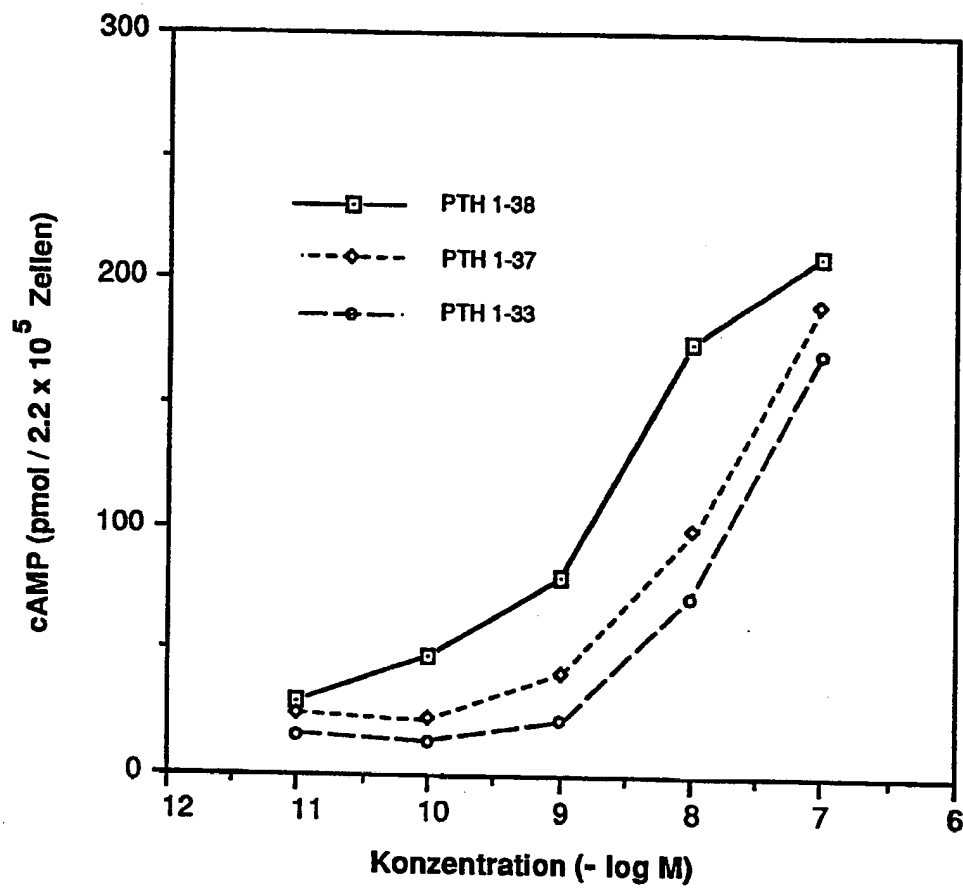
11/17

Abbildung 11



12/17

Abbildung 12



13/17

Abbildung 13

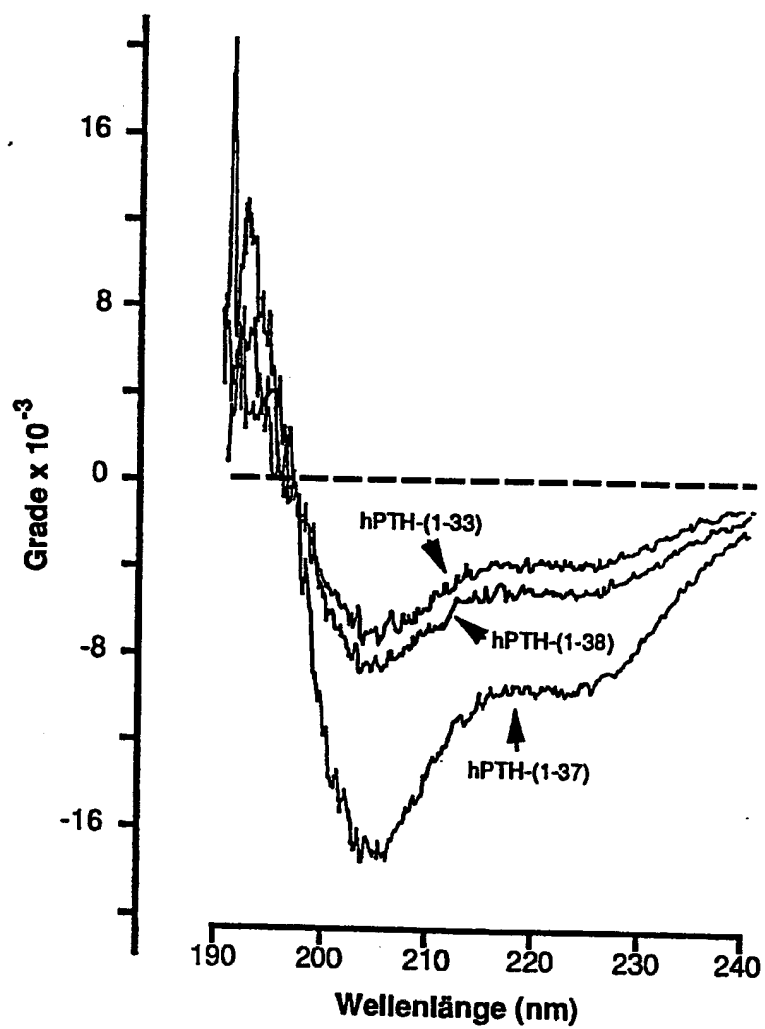


Abbildung 14

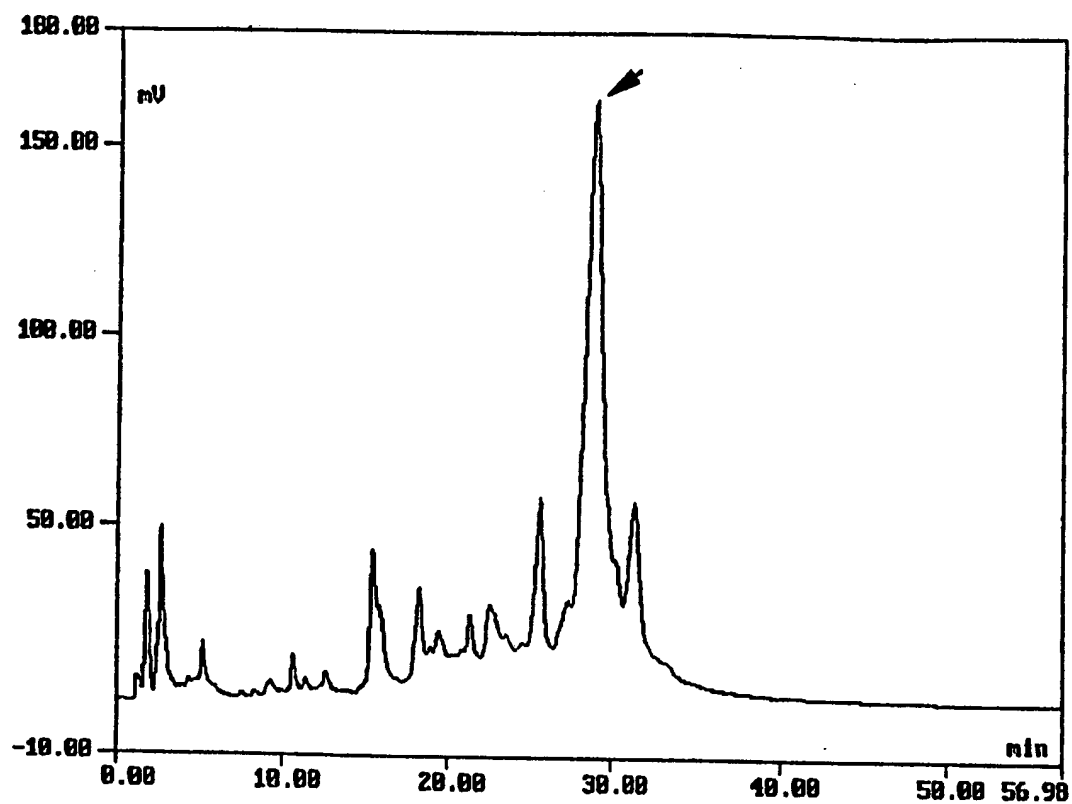
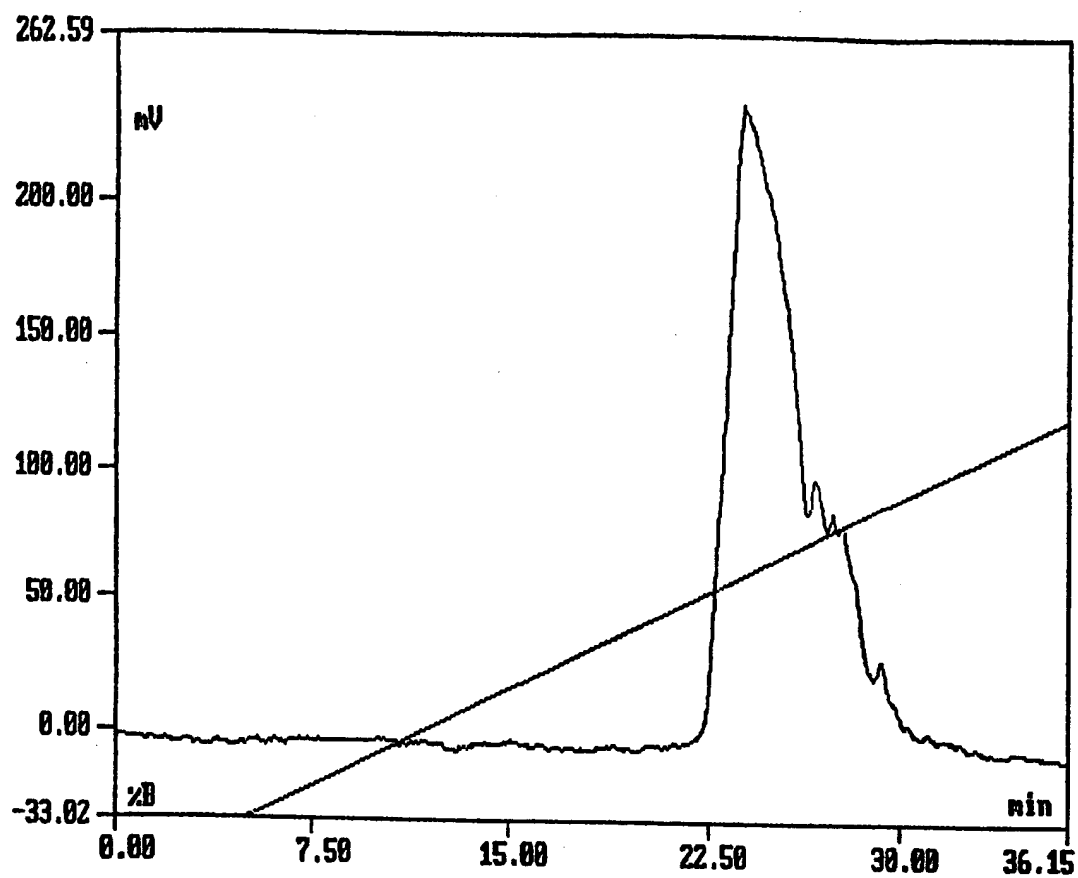
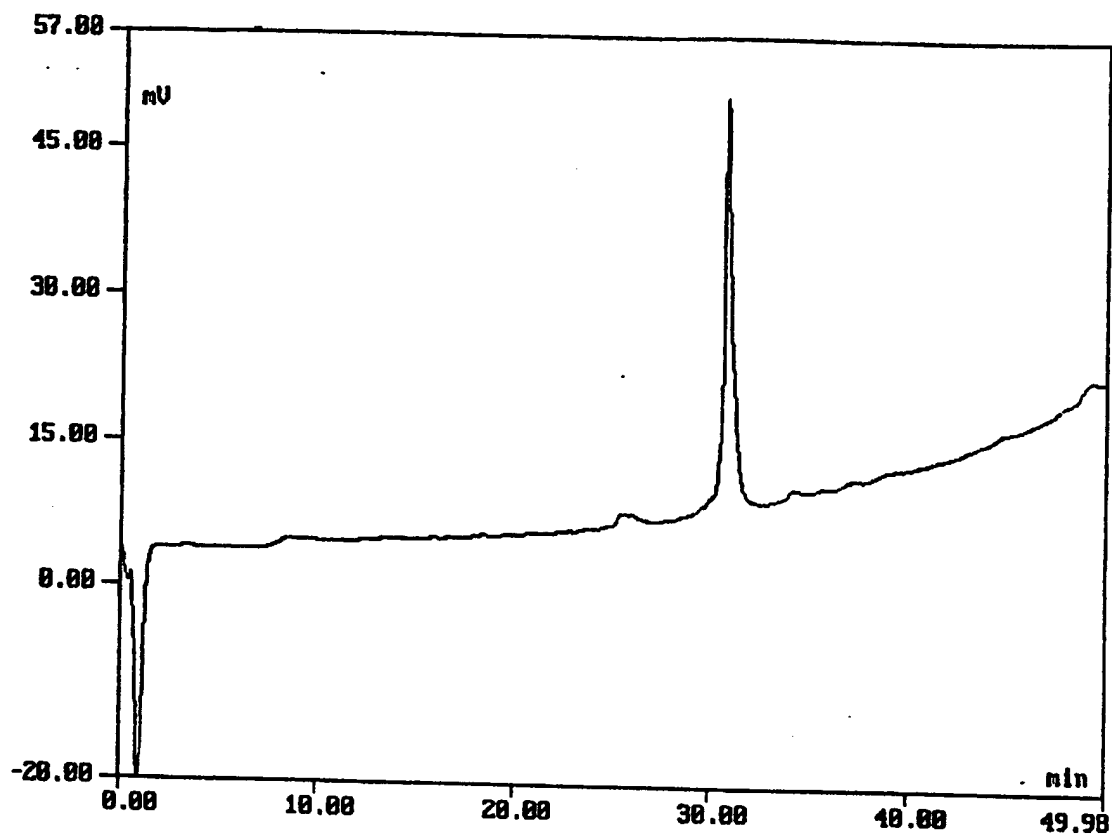


Abbildung 15



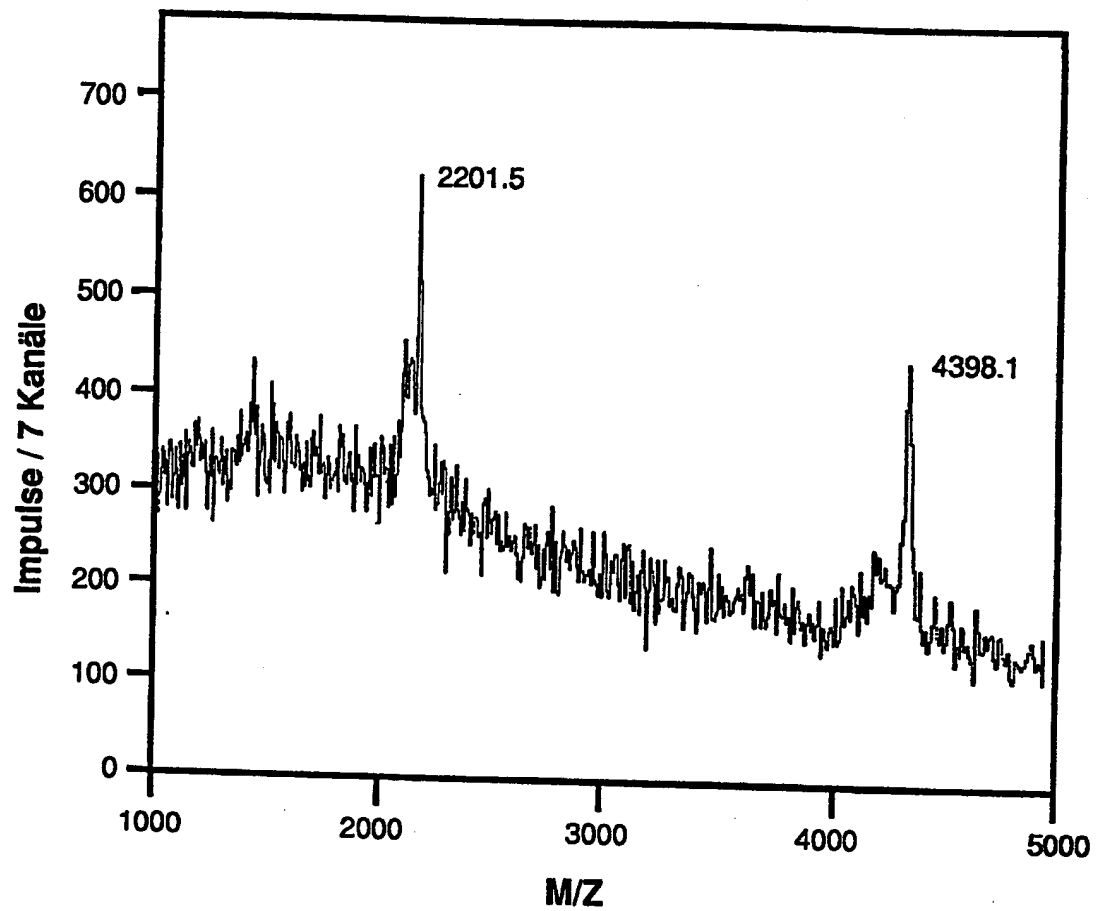
16/17

Abbildung 16



17/17

Abbildung 17



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No **PCT/EP 90/01807**

| | | |
|--|---|-------------------------------------|
| I. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER (If several classification symbols apply, indicate all) ⁶ According to International Patent Classification (IPC) or to both National Classification and IPC Int. Cl.⁵ C 07 K 7/10, A 61 K 37/24, G 01 N 33/74 | | |
| II. FIELDS SEARCHED | | |
| Minimum Documentation Searched ⁷ | | |
| Classification System | Classification Symbols | |
| Int. Cl.⁵ | A 61 K; C 07 K | |
| Documentation Searched other than Minimum Documentation to the Extent that such Documents are Included in the Fields Searched ⁸ | | |
| III. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT ⁹ | | |
| Category ¹⁰ | Citation of Document, ¹¹ with Indication, where appropriate, of the relevant passages ¹² | Relevant to Claim No. ¹³ |
| X | Chemical Abstracts, volume 102, No. 17, 29 April 1985, (Columbus, Ohio, US), Zull, James E et al.: "Characterization of parathyroid hormone fragments produced by cathepsin D.", see page 97, abstract 143622q, & J. Biol. Chem. 1985, 260 (3), 1608-1613 | 1-5 |
| --- | | |
| X | Chemical Abstracts, volume 106, No.5, 2 February 1987, (Columbus, Ohio, US), Pillai, Sreekumar et al.: "Production of biologically active fragments of parathyroid hormone by isolated Kupffer cells", see page 92, abstract 28085n, & J. & J. Biol Chem. 1986, 261(32), 14919-14923 | 1-5 |
| --- | | |
| ./. | | |
| <div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div style="width: 45%;"> <p>¹⁰ Special categories of cited documents:</p> <p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"E" earlier document but published on or after the international filing date</p> <p>"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> </div> <div style="width: 45%;"> <p>"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step</p> <p>"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.</p> <p>"&" document member of the same patent family</p> </div> </div> | | |
| IV. CERTIFICATION | | |
| Date of the Actual Completion of the International Search | Date of Mailing of this International Search Report | |
| 25 February 1991 (25.02.91) | 22 March 1991 (22.03.91) | |
| International Searching Authority | Signature of Authorized Officer | |
| European Patent Office | | |

III. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT (CONTINUED FROM THE SECOND SHEET)

| Category * | Citation of Document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to Claim No |
|------------|--|----------------------|
| A | EP, A2, 0110294 (HESCH, ROLF DIETER) 13 June 1984 see the whole document ----- | 1-5 |
| A | Patent Abstracts of Japan, volume 7, No.39 C151, abstract bis JP 57-192350, publ 1982 11-26 Tanpakushitsu Kenkiyuu Shiyoureikai ----- | 1-5 |
| A | EP, A2, 0293159 (MERCK & CO. INC.) 30 November 1988, see the whole document ----- | 1-5 14 |

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM THE SECOND SHEET

V. ☒ OBSERVATIONS WHERE CERTAIN CLAIMS WERE FOUND UNSEARCHABLE :

This International search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2) (a) for the following reasons:

1. ☐ Claim numbers because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

Process for therapeutic treatment of the animal or human body. (rule 39 (IV))

2. ☐ Claim numbers because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claim numbers because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of PCT Rule 6.4(a).

VI. ☐ OBSERVATIONS WHERE UNITY OF INVENTION IS LACKING :

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims of the international application.
2. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims of the international application for which fees were paid, specifically claims:
3. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claim numbers:
4. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, the International Searching Authority did not invite payment of any additional fee.

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by applicant's protest.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen PCT/EP 90/01807

| I. KLASSIFIKATION DES ANMELDUNGSGENSTANDS (bei mehreren Klassifikationssymbolen sind alle anzugeben) ⁶ Nach der internationalen Patentklassifikation (IPC) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPC Int.Cl. ⁵ C 07 K 7/10, A 61 K 37/24, G 01 N 33/74 | | | | | | | | | | | |
|--|---|----------------------------------|--|--|---|---|--|-----|---|---|-----|
| II. RECHERCHIERTE SACHGEBIETE <div style="text-align: center; border: 1px solid black; padding: 2px; margin: 5px 0;">Recherchierter Mindestprüfstoff⁷</div> <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width: 20%; padding: 5px;">Klassifikationssystem Int.Cl.⁵</td> <td style="padding: 5px;">Klassifikationssymbole A 61 K; C 07 K</td> </tr> </table> <div style="text-align: center; border: 1px solid black; padding: 2px; margin: 5px 0;">Recherchierte nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Sachgebiete fallen⁸</div> | | | Klassifikationssystem Int.Cl. ⁵ | Klassifikationssymbole A 61 K; C 07 K | | | | | | | |
| Klassifikationssystem Int.Cl. ⁵ | Klassifikationssymbole A 61 K; C 07 K | | | | | | | | | | |
| III. EINSCHLÄGIGE VERÖFFENTLICHUNGEN⁹ <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th style="width: 10%; padding: 5px;">Art *</th> <th style="width: 70%; padding: 5px;">Kennzeichnung der Veröffentlichung¹¹, soweit erforderlich unter Angabe der maßgeblichen Teile¹²</th> <th style="width: 20%; padding: 5px;">Betr. Anspruch Nr.¹³</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td style="text-align: center; vertical-align: top; padding: 5px;">X</td> <td style="padding: 5px;"> Chemical Abstracts, Band 102, Nr. 17, 29 April 1985, (Columbus, Ohio, US), Zull, James E et al.: "Characterization of parathyroid hormone fragments produced by cathepsin D.", siehe Seite 97, Zusammenfassung 143622q, & J. Biol. Chem. 1985, 260(3), 1608-1613 <div style="text-align: center;">--</div> </td> <td style="text-align: center; vertical-align: top; padding: 5px;">1-5</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center; vertical-align: top; padding: 5px;">X</td> <td style="padding: 5px;"> Chemical Abstracts, Band 106, Nr. 5, 2 Februar 1987, (Columbus, Ohio, US), Pillai, Sreekumar et al.: "Production of biologically active fragments of parathyroid hormone by isolated Kupffer cells", siehe Seite 92, Zusammenfassung 28085n, & J. Biol. Chem. 1986, 261(32), 14919-14923 <div style="text-align: center;">--</div> </td> <td style="text-align: center; vertical-align: top; padding: 5px;">1-5</td> </tr> </tbody> </table> <div style="margin-top: 10px;"> <p>* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen¹⁰:</p> <div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div style="width: 48%;"> <p>"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist</p> <p>"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist</p> <p>"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)</p> <p>"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht</p> <p>"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist</p> </div> <div style="width: 48%;"> <p>"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist</p> <p>"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden</p> <p>"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist</p> <p>"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist</p> </div> </div> </div> | | | Art * | Kennzeichnung der Veröffentlichung ¹¹ , soweit erforderlich unter Angabe der maßgeblichen Teile ¹² | Betr. Anspruch Nr. ¹³ | X | Chemical Abstracts, Band 102, Nr. 17, 29 April 1985, (Columbus, Ohio, US), Zull, James E et al.: "Characterization of parathyroid hormone fragments produced by cathepsin D.", siehe Seite 97, Zusammenfassung 143622q, & J. Biol. Chem. 1985, 260(3), 1608-1613 <div style="text-align: center;">--</div> | 1-5 | X | Chemical Abstracts, Band 106, Nr. 5, 2 Februar 1987, (Columbus, Ohio, US), Pillai, Sreekumar et al.: "Production of biologically active fragments of parathyroid hormone by isolated Kupffer cells", siehe Seite 92, Zusammenfassung 28085n, & J. Biol. Chem. 1986, 261(32), 14919-14923 <div style="text-align: center;">--</div> | 1-5 |
| Art * | Kennzeichnung der Veröffentlichung ¹¹ , soweit erforderlich unter Angabe der maßgeblichen Teile ¹² | Betr. Anspruch Nr. ¹³ | | | | | | | | | |
| X | Chemical Abstracts, Band 102, Nr. 17, 29 April 1985, (Columbus, Ohio, US), Zull, James E et al.: "Characterization of parathyroid hormone fragments produced by cathepsin D.", siehe Seite 97, Zusammenfassung 143622q, & J. Biol. Chem. 1985, 260(3), 1608-1613 <div style="text-align: center;">--</div> | 1-5 | | | | | | | | | |
| X | Chemical Abstracts, Band 106, Nr. 5, 2 Februar 1987, (Columbus, Ohio, US), Pillai, Sreekumar et al.: "Production of biologically active fragments of parathyroid hormone by isolated Kupffer cells", siehe Seite 92, Zusammenfassung 28085n, & J. Biol. Chem. 1986, 261(32), 14919-14923 <div style="text-align: center;">--</div> | 1-5 | | | | | | | | | |
| IV. BESCHEINIGUNG <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width: 50%; padding: 5px;"> Datum des Abschlusses der internationalen Recherche 25. Februar 1991 </td> <td style="width: 50%; padding: 5px;"> Absendedatum des internationalen Recherchenberichts <div style="text-align: right; font-size: 1.2em;">22 MAR 1991</div> </td> </tr> <tr> <td style="width: 50%; padding: 5px;"> Internationale Recherchenbehörde <div style="text-align: center; margin-top: 10px;">Europäisches Patentamt</div> </td> <td style="width: 50%; padding: 5px;"> Unterschrift des bevollmächtigten Beizensteten <div style="text-align: right; margin-top: 10px;"> </div> </td> </tr> </table> | | | Datum des Abschlusses der internationalen Recherche 25. Februar 1991 | Absendedatum des internationalen Recherchenberichts <div style="text-align: right; font-size: 1.2em;">22 MAR 1991</div> | Internationale Recherchenbehörde <div style="text-align: center; margin-top: 10px;">Europäisches Patentamt</div> | Unterschrift des bevollmächtigten Beizensteten <div style="text-align: right; margin-top: 10px;"> </div> | | | | | |
| Datum des Abschlusses der internationalen Recherche 25. Februar 1991 | Absendedatum des internationalen Recherchenberichts <div style="text-align: right; font-size: 1.2em;">22 MAR 1991</div> | | | | | | | | | | |
| Internationale Recherchenbehörde <div style="text-align: center; margin-top: 10px;">Europäisches Patentamt</div> | Unterschrift des bevollmächtigten Beizensteten <div style="text-align: right; margin-top: 10px;"> </div> | | | | | | | | | | |

| III. EINSCHLÄGIGE VERÖFFENTLICHUNGEN (Fortsetzung von Blatt 2) | | |
|--|---|--------------------|
| Art * | Kennzeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der maßgeblichen Teile | Betr. Anspruch Nr. |
| A | EP, A2, 0110294 (HESCH, ROLF DIETER) 13 Juni 1984, siehe Dokument insgesamt -- | 1-5 |
| A | Patent Abstracts of Japan, Band 7, Nr 39, C151, Zusammenfassung von JP 57-192350, publ 1982-11-26 Tanpakushitsu Kenkiyuu Shiyoureikai -- | 1-5 |
| A | EP, A2, 0293159 (MERCK & CO. INC.) 30 November 1988, siehe Dokument insgesamt -- ----- | 1-5, 14 |

WEITERE ANGABEN ZU BLATT 2

V. BEMERKUNGEN ZU DEN ANSPRÜCHEN, DIE SICH ALS NICHT RECHERCHIERBAR ERWIESEN HABEN¹

Gemäß Artikel 17 Absatz 2 Buchstabe a sind bestimmte Ansprüche aus folgenden Gründen nicht Gegenstand der internationalen Recherche gewesen:

1. ☒ Ansprüche Nr. 6, 13, 15, weil sie sich auf Gegenstände beziehen, die zu recherchieren die Behörde nicht verpflichtet ist, nämlich
Verfahren zur therapeutischen Behandlung des menschlichen oder tierischen Körpers. Regel 39 (iv).
2. ☐ Ansprüche Nr., weil sie sich auf Teile der internationalen Anmeldung beziehen, die den vorgeschriebenen Anforderungen so wenig entsprechen, daß eine sinnvolle internationale Recherche nicht durchgeführt werden kann, nämlich
3. ☐ Ansprüche Nr., weil sie abhängige Ansprüche und nicht entsprechend Satz 2 und 3 der Regel 6.4 a) PCT abgefaßt sind.

VI. BEMERKUNGEN BEI MANGELNDER EINHEITLICHKEIT DER ERFINDUNG²

Die Internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, daß diese internationale Anmeldung mehrere Erfindungen enthält:

1. ☐ Da der Anmelder alle erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich der internationale Recherchenbericht auf alle recherchierbaren Ansprüche der internationalen Anmeldung.
2. ☐ Da der Anmelder nur einige der erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich der internationale Recherchenbericht nur auf die Ansprüche der internationalen Anmeldung, für die Gebühren gezahlt worden sind, nämlich
3. ☐ Der Anmelder hat die erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren nicht rechtzeitig entrichtet. Der internationale Recherchenbericht beschränkt sich daher auf die in den Ansprüchen zuerst erwähnte Erfindung; sie ist in folgenden Ansprüchen erfaßt:
4. ☐ Da für alle recherchierbaren Ansprüche eine Recherche ohne einen Arbeitsaufwand durchgeführt werden konnte, der eine zusätzliche Recherchegebühr gerechtfertigt hätte, hat die Internationale Recherchenbehörde eine solche Gebühr nicht verlangt.

Bemerkung hinsichtlich eines Widerspruchs

- ☐ Die zusätzlichen Gebühren wurden vom Anmelder unter Widerspruch gezahlt.
☐ Die Zahlung zusätzlicher Gebühren erfolgte ohne Widerspruch.